

Unterschiedliche Rollen des Adaptor-Proteins Blown fuse/Skap-Hom/Scap2 und
des Aktin-Regulators Kette/Hem2/Nap1 während der somatischen und viszeralen
Myogenese von *Drosophila melanogaster*

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Roxane Henriette Schröter
aus
Frankfurt am Main



Marburg an der Lahn,
20. September 2006

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität als Dissertation am _____
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
Zweitgutachter: Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung _____

Tag sein, dass
für eine bessere

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

- **Roxane Schröter**, Simone Lier, Anne Holz, Lothar Beck, Sven Bogdan, Christian Klämbt und Renate Renkawitz-Pohl: *kette* and *blown fuse* interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development* (2004), 131, 4501-4509
- **Roxane Schröter**, Detlev Buttgereit, Lothar Beck, Anne Holz und Renate Renkawitz-Pohl: Blown fuse regulates stretching and outgrowth but not myoblast fusion of the circular viszeral muscles in *Drosophila*. *Differentiation* (2006), doi: 10.1111/j.1432- 0436.2006.00080.x.

Mag sein, dass der Jüngste Tag morgen anbricht,
dann wollen wir gerne die Arbeit
für eine bessere Zukunft aus der Hand legen,
vorher aber nicht.
(Dietrich Bonhoeffer)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	12
I. Einleitung	14
1. Die Muskulatur von <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.1. <i>Drosophila</i> verfügt über drei verschiedene Muskeltypen	15
1.2. Aufbau der somatischen Bewegungsmuskulatur und der viszeralen Mitteldarm-Muskeln	16
2. Die somatische Körperwand-Muskulatur von <i>Drosophila melanogaster</i> entwickelt sich durch multiple Zell-Zell-Fusionen aus dem somatischen Mesoderm und ist an der Epidermis verankert	19
2.1. Durch laterale Inhibition werden im somatischen Mesoderm Muskel- Progenitor-Zellen und in der Folge Muskel-Founder-Zellen und fusi- onskompetente Myoblasten gebildet	20
2.2. Die Founder-Zellen fusionieren mit mehreren fusionskompetenten Myo- blasten zu einem vielkernigen Muskel-Synzytium	21
2.2.1. Ultrastrukturelle Merkmale im Verlauf der somatischen Myo- blastenfusion (Doberstein et al., 1997)	21
2.2.2. Proteine, die an der somatischen Myoblastenfusion beteiligt sind	22
2.3. Die Anheftung der Synzytien an die Epidermis und der Aufbau des Sarkomers sind zum Teil von Faktoren abhängig, die auch die Myo- blastenfusion steuern	27
3. Blown fuse als Faktor in der somatischen Myogenese	28
4. Der aus der Neurogenese bekannte Aktin-Regulator Kette/Hem2/Nap1 wird ebenfalls für die Myoblastenfusion benötigt	31
5. Die Founder-Zell-Hypothese trifft auch für die viszeralen Mitteldarm- Muskeln zu	34
5.1. Die Founder-Zellen der Mitteldarm-Muskeln stammen aus verschie- denen Teilen des Mesoderms	34
5.2. Die Zell-Zell-Erkennung bei der Bildung der zirkulären Mitteldarm- Muskeln wird durch Duf und Sns vermittelt	35
6. Membranfusionen, die Immunologische Synapse und die Fusionskomplex- Theorie	37
6.1. Membranfusionen und Zell-Zell-Fusionen	37
6.2. Die Immunologische Synapse	40

6.3. Die Fusionskomplex-Theorie	41
7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	43
 II. Material und Methoden	 44
8. Allgemeine Materialien	45
8.1. Laborgeräte	45
8.2. Chemikalien	46
8.3. Fliegenstämme	47
8.4. Bakterien	48
8.5. Synthetische Oligonukleotide	49
8.6. Plasmide	49
8.7. Enzyme	50
8.8. Antikörper und Seren	50
8.9. Internet-Server und Analyse-Programme	52
 9. Umgang mit <i>Drosophila melanogaster</i>	 53
9.1. Zucht und Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	53
9.1.1. Zucht- und Nährmedien	53
9.1.2. Stammhaltung	53
9.1.3. Kreuzungsexperimente	54
9.1.4. Sammlung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	54
9.2. Etablierung transgener <i>Drosophila</i> -Stämme	54
9.2.1. P-Element-Transformation	54
9.2.2. Etablierung stabil-transgener <i>Drosophila</i> -Linien	55
 10. Histologische Methoden	 56
10.1. Vorbereitung von <i>Drosophila</i> -Embryonen zur histologischen Analyse	56
10.1.1. Sammeln der Embryonen	56
10.1.2. Entfernung des Chorions	56
10.1.3. Entfernung der Vitellinmembran	57
10.1.4. Formaldehydfixierung	57
10.1.5. Glutaraldehyd-Fixierung	57
10.1.6. Heißfixierung	58
10.1.7. Fixierung für die Raster-Elektronenmikroskopie	58
10.1.8. Fixierung für die Transmissions-Elektronenmikroskopie	58
10.2. Spezifischer Proteinnachweis an <i>whole-mount</i> Präparaten	58
10.2.1. Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörperrnachweis	59
10.2.2. Antikörperdetektion nach der Avidin-Biotinylated-Enzyme-Complex Methode	59
10.2.2.1. Verstärkung von Färbungen mit dem TSA-Kit	60
10.3. mRNA-Nachweis an <i>whole-mount</i> -Präparaten	60
10.3.1. Herstellung von DIG-Oxygenin-markierten RNA-Sonden durch in-vitro-Transkription	61
10.3.2. Herstellung von DIG-Oxygenin-markierten DNA-Sonden per PCR	61

10.3.3. Spot-Test für DIG-Oxygenin-markierte Sonden	61
10.3.4. <i>in-situ</i> -Hybridisierung	62
10.3.5. Fluoreszenz <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	62
10.4. Nachweis von β -Galactosidase-Aktivität mittels X-Gal-Blaufärbung an Embryonen	63
10.5. Detektion von F-Aktin mittels Phalloidin	64
10.6. Einbettung von <i>whole-mount</i> -Präparaten	64
10.7. Raster-Elektronenmikroskopie	65
10.8. Transmissions-Elektronenmikroskopie	65
10.8.1. Vorkontrastierung und Einbettung	66
10.8.2. Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte	67
10.8.3. Kontrastierung und Auswertung der Ultradünnschnitte	67
11. Präparation, enzymatische Manipulation und Analyse von Nukleinsäuren	68
11.1. Isolierung genomischer DNA aus <i>Drosophila</i>	68
11.1.1. Isolierung genomischer DNA aus einem Fliegen-Pool	68
11.1.2. Isolierung von Single-Fly-DNA	68
11.2. Fällung von Desoxyribonukleinsäuren	69
11.2.1. Isopropanolfällung	69
11.2.2. Ethanolfällung	69
11.3. Polymerasekettenreaktion	69
11.4. Klonierung mit Hilfe des pCRII-TOPO-Kits	70
11.5. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	71
11.6. Transformation chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	71
11.7. Plasmid-Präparation aus <i>E.coli</i>	72
11.7.1. Alkalische-Lyse von <i>E.coli</i> im analytischen Maßstab	73
11.7.2. Alkalische-Lyse von <i>E.coli</i> im präparativen Maßstab	73
11.8. Restriktionsanalyse von DNA-Fragmenten	73
11.9. Dephosphorylierung von freien 5'Enden	74
11.10 Ligation von DNA-Fragmenten	74
11.11 Nukleinsäure-Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese	74
11.12 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	75
11.13 Aufreinigung von DNA mit Hilfe von GFX-Säulen	75
11.14 Sequenzanalyse	76
12. Präparation und Analyse von Proteinen	77
12.1. Extraktion von Proteinen aus <i>Drosophila</i> -Embryonen	77
12.2. <i>in-vitro</i> -Transkription mit dem TNT-System	77
12.3. <i>in-vitro</i> -Phosphorylierungs-Test	78
12.4. Bradford-Test	78
12.5. Immunpräzipitation	78
12.5.1. Klären des Lysates	79
12.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	79
12.7. Coomassie-Protein-Nachweis	80
12.8. Western-Blot	81
12.8.1. Detektion von biotinylierten Proteinen im Western-Blot	82
12.9. MALDI-Tof	82

III. Ergebnisse	83
13. Entwicklung der Mitteldarm-Ringmuskeln	84
13.1. Morphologie der Mitteldarm-Muscularis	84
13.1.1. Morphologie der Mitteldarm-Muscularis von <i>Drosophila melanogaster</i>	84
13.1.2. Morphologie der Mitteldarm-Muscularis von <i>Schistocerca gregaria</i> und <i>Manduca sexta</i> im Vergleich zu <i>Drosophila melanogaster</i>	85
13.2. Ultrastrukturelle Analyse der Fusion der Ringmuskel-Founder-Zellen mit den fusionskompetenten Myoblasten	88
13.2.1. Die Fusion der zirkulären Founder-Zellen mit den fusionskompetenten Myoblasten findet nur partiell statt	88
13.2.2. Ultrastruktureller Vergleich der ersten somatischen Fusion und der Fusion der Ringmuskel-Founder-Zelle mit ihrer fusionskompetenten Myoblaste	90
13.3. Entwicklung der Netzstruktur der Ringmuskeln	90
13.3.1. Entwicklung der Netzstruktur der Ringmuskeln im Lichtmikroskop	91
13.3.2. Entwicklung der Netzstruktur der Ringmuskeln im TEM	91
14. Expressionsmuster von <i>Blown fuse</i> und <i>Kette</i>	94
14.1. <i>Blow</i> ist in allen Myoblasten des lateralen viszeralen Mesoderms exprimiert, im somatischen Mesoderm jedoch auf die fusionskompetenten Myoblasten beschränkt	94
14.2. Enhancer-Elemente für die Transkription von <i>blow</i> im viszeralen und somatischen Mesoderm sind im ersten Intron des Gens zu finden	97
14.2.1. Ein spezieller Enhancer zur Steuerung der <i>blown fuse</i> -Transkription im viszeralen Mesoderm liegt im ersten Intron im Bereich der Basenpaare +509 bis +1072	98
14.2.2. Suche nach Bindestellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb der gefundenen Enhancerelemente	98
14.3. <i>Kette</i> ist während der Myogenese-relevanten Entwicklungsstadien ubiquitär im Embryo verteilt	100
15. Charakterisierung des viszeralen Phänotyps von <i>blow</i>- und <i>kette</i>-mutanten Embryonen	102
15.1. Die viszeralen Founder-Zellen und die fusionskompetenten Myoblasten sind in beiden Mutanten vorhanden	102
15.1.1. Die Founder der zirkulären Muskeln sind vorhanden	102
15.1.2. Die Founder der longitudinalen Muskeln sind vorhanden und wandern entlang der zirkulären Muskeln ein	103
15.1.3. Die fusionskompetenten Myoblasten exprimieren in beiden Mutanten <i>sns</i>	104
15.2. Die zirkulären Founder-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten <i>blow</i> - bzw. <i>kette</i> -mutanter Embryonen fusionieren miteinander	104
15.3. <i>blow</i> - und <i>kette</i> -mutante Embryonen weisen Störungen bei der Streckung der zirkulären viszeralen Muskeln um den Darm auf	106

16. Charakterisierung des somatischen Phänotyps von <i>blow</i>- und <i>kette</i>-mutanten Embryonen	108
16.1. Beide Populationen somatischer Myoblasten werden in <i>blow</i> - und <i>kette</i> -mutanten Embryonen determiniert	108
16.2. <i>blow</i> - und <i>kette</i> -mutante Embryonen bilden Muskelvorläufer, die bis zu vier Kerne enthalten	108
16.3. Die Myoblastenfusion von <i>kette</i> -mutanten Embryonen endet mit morphologisch aberranten elektronendichten Plaques	111
16.4. <i>kette</i> ^{G1-37} -mutante Embryonen zeigen Fehler bei der Anheftung der somatischen Muskeln an die Epidermis	113
16.5. <i>kette</i> ^{J4-48} -mutante Embryonen haben vergrößerte, unregelmäßige Aktin-Foci während <i>kette</i> ^{G1-37} -mutante Embryonen Lücken im Aktin-Arrangement der somatischen Muskeln zeigen	115
17. Zusammenspiel von Kette und Blow	117
17.1. Im somatischen Mesoderm agiert Kette downstream von Blow	117
17.1.1. <i>kette</i> und <i>blow</i> interagieren genetisch miteinander	117
17.1.2. Ein Überschuss an Kette rettet den <i>blow</i> -Phänotyp partiell . .	118
17.2. Im viszeralen Mesoderm kann keine zeitliche Reihung zwischen Blow und Kette festgestellt werden	120
18. Aufstellung einer Hypothese zur Funktion und evolutionären Konservierung des Proteins Blown fuse	121
18.1. Das PH-Domänen-Protein Blown fuse kann vermutlich durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert werden und aufgrund seiner Primärstruktur mit SH2- und SH3-Domänen wechselwirken . . .	121
18.1.1. Molekulargewicht und pI	121
18.1.2. Globale Protein-Domänen und zytologische Lokalisation . . .	121
18.1.3. Peptid-cutter, Signalpeptide und posttranslationale Modifikation	121
18.1.4. Putative posttranslationale Modifizierung durch Phosphorylierung	122
18.1.5. Suche nach Bindemotiven für Protein-Protein-Wechselwirkungen	122
18.1.6. Substratmotive, die von spezifischen Proteinkinasen erkannt werden	125
18.1.7. Korrelierung der putativen Phosphorylierungs-Stellen mit den gefundenen Protein-Binde- und Substratmotiven	127
18.1.8. Auswertung von Yeast-Two-Hybrid-Massenscreen-Datenbanken	128
18.2. Evolutionäre Konservierung von Blow	129
18.2.1. Blown fuse in anderen <i>Drosophila</i> -Species	129
18.2.2. Das durch ENSANGG00000024571 codierte <i>Anopheles</i> -Protein ist ortholog zu Blown fuse.	130
18.2.3. Blow ist ortholog zu den Wirbeltier-Proteinen Src-kinase-associated-phosphoprotein-of-55kD (SKAP-55/Scap1) und Skap-Hom/Skap-55R/Scap 2	131

18.2.4. Ektopische Expression des Proteins Scap2/Skap-Hom/Skap-55R in der <i>twist</i> -Domäne verursacht Störungen bei der Bildung der Muskulatur, ist aber nicht in der Lage, den <i>blown fuse</i> -Phänotyp zu retten	131
18.3. Wird Blow phosphoryliert?	132
18.3.1. <i>in-vitro</i> -Phosphorylierungstest	132
18.3.2. <i>in-vivo</i> -Ansatz zur Klärung der Frage nach der putativen Phosphorylierung von Blow	134
19. Suche nach SH2- und SH3-Domänen enthaltenden Proteinen, cytoplasmatischen Kinasen und Co-Faktoren, die an der putativen Phosphorylierung von Blow beteiligt sein können	136
19.1. Ein verringerter <i>crk</i> -mRNA-Level im somatischen Mesoderm verursacht ein gestörtes Muskelmuster, begleitet von unfusionierte Myoblasten	136
19.1.1. Herstellung eines <i>crk</i> -knockdown-Konstruktes	136
19.1.2. Knockdown von <i>crk</i> im somatischen Mesoderm	137
19.2. Phänotyp-Analysen an Mutationen in Genen, die für möglicherweise an der Phosphorylierung von Blow beteiligte zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen codieren	139
19.2.1. <i>Src42A</i> -mutante Embryonen zeigen teilweise unfusionierte Myoblasten, haben jedoch keinen primären Fusionsdefekt	139
19.2.2. <i>Btk</i> -mutante Embryonen zeigen starke Beeinträchtigungen beim Dorsalschluss	139
19.2.3. <i>Src64B</i> -mutante Embryonen zeigen keinen Muskelphänotyp	141
19.2.4. <i>Src42A-Btk</i> -Doppelmutanten haben keinen primären Fusionsdefekt	141
19.2.5. <i>Abl^l</i> -mutante Embryonen haben dünne und teilweise fehlgeleitete Muskeln, aber keine unfusionierten Myoblasten	141
19.2.6. <i>Abl^l</i> -mutante Embryonen zeigen dünne Muskeln und viele unfusionierte Myoblasten	141
19.2.7. Ektopische Expression eines Bcr:Abl-Chimären-Proteins in der <i>twist</i> -Domäne führt zu starken Defekten im frühen Mesoderm	142
19.3. Suche nach weiteren im Kontext von Blow und den untersuchten Tyrosin-Kinasen an der Myogenese beteiligten Komponenten	142
19.3.1. Disabled wird nicht im embryonalen Mesoderm exprimiert, sondern ist auf das ZNS beschränkt	143
19.3.2. <i>Cbl</i> , <i>enabled</i> , und <i>kelch</i> -mutante Embryonen zeigen keine Fusionsdefekte	144
19.3.3. <i>twist</i> -Gal4-gesteuerte Aktivierung einer EP-Insertion im putativen Promotor-Bereich von <i>paxillin</i> führt zu starken Defekten bei der Entwicklung des somatischen Mesoderms	144
IV. Diskussion	146
20. Die Organisation der Mitteldarm-Muscularis ist angepasst an die Fressgewohnheiten von <i>Drosophila melanogaster</i>	147

20.1. Die Netzform der Ringmuskeln und die Verflechtung mit den Längsmuskeln erlauben große Kraft bei geringer Masse und gewährleisten eine kontinuierliche Stabilisierung des Mitteldarm-Epithels.	147
20.2. Bei <i>Schistocerca</i> findet die Peristaltik nicht durch die Mitteldarm-Muskeln statt	148
20.3. Insekten, deren Darmvolumen durch diskontinuierliche Fressgelegenheiten stark schwankt, zeigen eine weniger starke Verflechtung der Mitteldarm-Muscularis	148
20.4. Die Organisation der Mitteldarm-Muscularis ist nicht abhängig von der Zugehörigkeit zu einer Systematischen Einheit	149

21. Morphologische Gegenüberstellung der beiden untersuchten Fusionsmechanismen und die Verwendung von Blow und Kette in beiden **151**

21.1. Die Entwicklung der somatischen Muskeln beinhaltet den zweistufigen Fusionsprozess und das Anheften der Muskeln an die Epidermis . . .	151
21.1.1. Der erste Fusionsschritt erfolgt zwischen unmittelbar benachbarten Zellen und benötigt daher keinen Fusionskomplex . . .	153
21.1.2. Der ultrastrukturelle Feinablauf im zweiten Schritt könnte mit der Fusionskomplex-Theorie korrelieren	153
21.1.3. Einordnung von Blow und Kette in den Zweistufen-Mechanismus der somatischen Myoblastenfusion	154
21.2. Ein Gleichgewicht von Blown fuse und Kette steuert die Weiterentwicklung des somatischen Fusionskomplexes	157
21.2.1. Die beobachteten Phänotypen weisen auf eine Beteiligung von Blow und Kette beim radiären Auseinanderziehen des Fusionskomplexes hin	157
21.2.2. Die genetische Interaktion von <i>blow</i> und <i>kette</i> im somatischen Mesoderm zeigt, dass beide Gene in einem fein abgestimmten Mechanismus wirken.	158
21.3. Die Entwicklung der zirkulären Mitteldarm-Muskeln beinhaltet die Fusion der zirkulären Founder-Zellen mit den viszeralen fusionskompetenten Myoblasten und die Bildung der Netzstruktur während der Streckung um den Darm	159
21.3.1. Die Fusion der zirkulären Founder-Zelle und der fusionskompetenten Myoblaste erfolgt zwischen unmittelbar benachbarten Zellen und erfordert daher keinen Fusionskomplex	160
21.3.2. Die Entwicklung der Netzstruktur wird durch die partielle Fusion begünstigt	161
21.3.3. Die Verflechtung der zirkulären und longitudinalen Muskeln könnte während der Fusion der longitudinalen Muskelvorläufer-Zellen stattfinden	162
21.4. Das Strecken des Syncytiums um den Darm erfordert die Bildung eines korrekt organisierten Aktin-Netzwerkes, was in <i>kette</i> -mutanten Embryonen gestört ist	163
21.5. Vergleich der zirkulären viszeralen und der somatischen Myogenese .	164
21.5.1. Die partielle Fusion der zirkulären viszeralen Founder-Zelle mit den fusionskompetenten Myoblasten ist ein großer Unterschied zum ersten somatischen Fusionsschritt	164

21.5.2. Der zweite somatische Fusionsschritt hat kein Äquivalent bei der Bildung der zirkulären Mitteldarm-Muskeln, da dort die Myoblastenfusion nach einem Schritt beendet wird	167
21.5.3. Die unterschiedliche Verwendung von Blow in der somatischen und der viszeralen Myogenese	167
21.5.4. Die Streckung der zirkulären Muskeln und die Anheftung der somatischen Muskeln könnten zur Neurogenese homologe Prozesse beinhalten	168
22. Putative Funktion von Blown fuse, erhalten durch Vergleich mit homologen Sequenzen	171
22.1. Die PH-Domäne intendiert eine Zytoskelett- oder Plasmamembran-assoziierte Funktion von Blown fuse	172
22.2. Der Sequenz-Vergleich mit Skap55R/Skap-Hom/Scap2 und die <i>in-silico</i> -Analyse legen eine Phosphorylierung an Position Y342 und die Funktion von Blow als Adaptor-Protein nahe	173
22.2.1. Skap-55R/Skap-Hom/Scap2 als Adaptor-Protein der T-Zell-Synapse	174
22.2.2. Die Phosphorylierung von Blown fuse kann sowohl durch die Abelson-Kinase als auch durch eine Src-Kinase erfolgen	175
22.3. Blow kann sowohl mit SH3- als auch mit SH2-Domänen interagieren .	176
22.3.1. Eine Interaktion mit dem SH2-SH3-Adaptor Crk könnte eine Translokation des cytoplasmatischen Blow-Proteins an die Membran verursachen	176
22.3.2. Möglicherweise ist Blow an einem Feedback-Loop zur Aktivierung zytoplasmatischer Tyrosin-Kinasen beteiligt	178
23. Molekulares Modell der somatischen Myoblastenfusion von <i>Drosophila melanogaster</i>: Das Adaptor-Protein Blown fuse/Skap-Hom/Scap2 und der Aktin-Regulator Kette/Hem2/Nap1 als Komponenten des Fusionskomplexes	181
23.1. Blow ist für die Initiation der Plaquebildung und die Stabilisierung der Rezeptorclustering verantwortlich, was vergleichbar der Rolle von Skap-55R/Skap-Hom/Scap-2 bei der Bildung des pSMAC ist	182
23.2. Kette wird für die geregelte Erweiterung des Fusionskomplexes benötigt	184
23.3. Fazit - Die somatischen Myoblastenfusion von <i>Drosophila melanogaster</i> ist von mindestens zwei unterschiedlichen, in den Foundern-/Muskelvorläufer-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten parallel ablaufenden molekularen Mechanismen abhängig	185
Literaturverzeichnis	188
Anhang	206

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es erstens aufzuklären, auf welche Weise die Fusion zu den zweikernigen zirkulären viszerale Mitteldarmmuskeln von *Drosophila melanogaster* stattfindet. Zweitens sollte untersucht werden, ob gewisse ultrastrukturelle Merkmale, nämlich die den Präfusionskomplex bildenden elektronendichten Vesikel und die elektronendichten Plaques, die bei der somatischen Myoblastenfusion auftreten, dort während der gesamten Myoblastenfusion vorkommen oder ob sie auf einen der beiden möglichen Fusions-Schritte beschränkt sind, was die Theorie über die Zweistufigkeit dieses Fusionsmechanismus unterstützen würde. Ausserdem sollte festgestellt werden, ob diese Merkmale auch bei der Fusion der zirkulären viszerale Myoblasten auftreten. Drittens sollte ein durch einen EMS-Screen aufgedecktes Gen, nämlich das für den Aktin-Regulator Kette/Hem2/Nap1 codierende *kette*, in die Kaskade fusionsrelevanter Gene eingruppiert werden, ausserdem sollte für *blown fuse* geklärt werden, ob es an einem möglichen ersten oder zweiten Fusionsschritt beteiligt ist. Darüberhinaus wurde für beide geprüft, ob sie auch an der Fusion zu den zirkulären viszerale Muskeln beteiligt sind. Schließlich sollte in Bezug auf die somatische Myoblastenfusion eine Hypothese über die molekulare Funktion des zytoplasmatischen Proteins Blown fuse entwickelt werden.

Die mit Hilfe von Licht- und Elektronenmikroskopie durchgeführten Analysen zeigten, dass sowohl die erste somatische als auch die zirkuläre viszerale Fusion ohne das Auftreten von Präfusionskomplexen und elektronendichten Plaques ablaufen. Während die initiale Kontaktstruktur zwischen beiden ähnlich ist, verläuft die darauf folgende Fusion völlig unterschiedlich und liefert im viszerale Mesoderm netzförmige, partiell fusionierte zirkuläre Mitteldarmmuskeln, im somatischen Mesoderm dagegen vollständig fusionierte drei- bis vierkernige Muskelvorläufer-Zellen. *blow* und *kette* scheinen auf beide Fusionen keinen Einfluss zu haben. Sie spielen bei der zweiten somatischen Myoblastenfusion und beim Strecken und Anheften sowohl der somatischen als auch der zirkulären viszerale Muskeln eine Rolle. Bei der Myoblastenfusion wirkt *kette*, das genetisch mit *blow* interagiert, downstream von *blow* und ein Funktionsverlust des Gen äussert sich in der Akkumulation von morphologisch aberranten elektronendichten Plaques. Für Blown fuse wurde mit Hilfe einer *in-silico*-Analyse festgestellt, dass es ortholog zu Skap-Hom/Skap-55R/Scap2 ist, einem in allen Wirbeltiern vorkommenden Immunzell-spezifischen Adaptor-Protein. Darauf basierend wurde eine Hypothese über die molekulare Funktion von Blown entwickelt, die die Interaktion mit dem SH2-SH3-Adaptor Crk sowie die posttranslationale Modifizierung in Form einer Phosphorylierung durch eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, möglicherweise die Abelson-Kinase oder eine Kinase der Src-bzw. Tec-Familie, beinhaltet. Erste Experimente weisen schließlich auf eine Beteiligung sowohl von Crk als auch der Abelson-Kinase an der Myoblastenfusion hin. Die gewonnenen Daten wurden abschließend in einem Modell zusammengefasst, das die molekularen Abläufe innerhalb des bei der zweiten somatischen Fusion auftretenden Fusionskomplexes beschreibt.

Teil I.

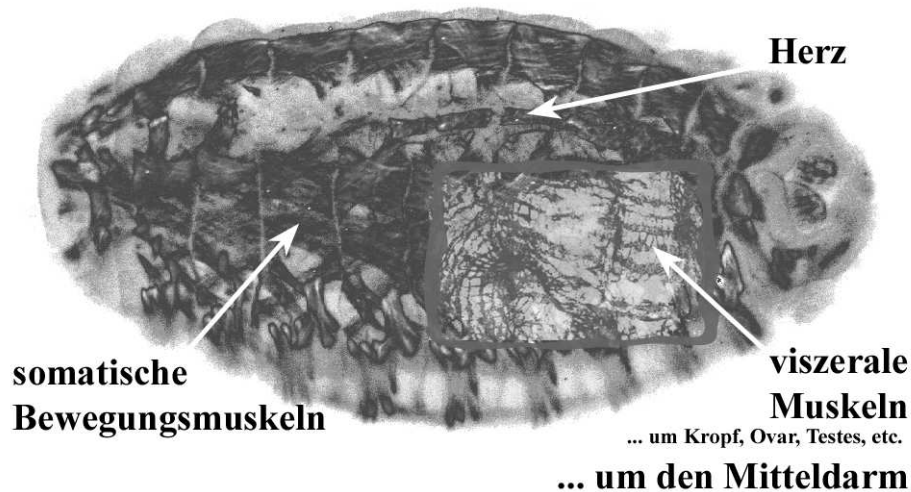
Einleitung

1. Die Muskulatur von *Drosophila melanogaster*

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Myogenese während der Embryonalentwicklung der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Dabei werden vor allem die somatische Körperwandmuskulatur, deren einzelne Myotuben häufig als Modell für die Myofibrillen der Vertebraten herangezogen werden, und die Ringmuskeln, die den Mitteldarm umspannen, betrachtet. In beiden Fällen gliedert sich die Myogenese in drei Schritte: 1. Determination der beteiligten Myoblasten-Populationen, nämlich Founder-Zellen und fusionskompetente Myoblasten, 2. Fusion der Myoblasten und 3. Wachstum, Streckung und Anheftung der syncytialen Muskeln. Die Determination der somatischen und in geringerem Umfang auch der viszeralen Myoblasten-Populationen ist in verschiedenen Arbeiten der vergangenen Jahre beschrieben und daher nicht Gegenstand der vorliegenden. Während allerdings auch über die Fusion zu den somatischen Muskeln eine große Zahl an Arbeiten angefertigt wurde, lag die Fusion der zirkulären Mitteldarm-Muskeln zu Beginn dieser Arbeit noch völlig im Dunkeln.

1.1. *Drosophila* verfügt über drei verschiedene Muskeltypen

Die Larven der Taufliege *Drosophila melanogaster* besitzen drei verschiedene Arten von Muskulatur: Die somatische Bewegungsmuskulatur der Körperwand, das Herz und die viszerale Muskulatur der inneren Organe (Abb. 1.1). Dabei unterscheidet sich das Herz von den beiden anderen vor allem dadurch, dass es ein funktionelles Syncytium darstellt. Darüberhinaus handelt es sich sowohl bei der somatischen als auch bei der viszeralen Muskulatur um quergestreifte Muskeln (Goldstein und Burdette, 1971; Sandborn et al., 1967), während die Kardiomyozyten von *Drosophila* eher an glatte Muskeln erinnern. Eine weitere Besonderheit der viszeralen Mitteldarmmuskeln ist die Syncytialität sowohl der zweikernigen zirkulären als auch der mehrkernigen longitudinalen Muskeln (Klapper, 2000; Klapper et al., 2001 und 2002; San Martin et al., 2001). Diese beiden Merkmale - die Streifung und die Mehrkernigkeit - unterscheiden die viszerale Mitteldarmmuskulatur von *Drosophila* deutlich von der viszeralen glatten Muskulatur der Wirbeltiere. Im Gegensatz dazu ist die



*Abbildung 1.1.: Muskulatur eines Embryos von *Drosophila melanogaster** Im Stadium 17 kurz vor dem Schlüpfen der Larve sind alle larvalen Muskeln gebildet: die an der Epidermis verankerten somatischen Bewegungsmuskeln, die viszerale Muskeln, die die inneren Organe umspannen, und das Herz (Immunhistologischer Nachweis von $\beta 3$ -Tubulin).

somatische Muskulatur in ihrem grundsätzlichen Aufbau mit den Myofibrillen der Wirbeltier-Skelettmuskulatur gut vergleichbar (Knudsen, 1992; Wakelam, 1985), so dass sie häufig als Modell zur Untersuchung von generellen Myogenese-Mechanismen dient. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zum einen mit der Entwicklung der zirkulären Mitteldarmmuskeln und zum anderen mit dem Einfluss der Gene *blown fuse* und *kette* auf die somatische aber auch auf die viszerale Myogenese. Es werden daher im Folgenden Aspekte, die das Herz und viszerale Muskeln um andere Organe als den Mitteldarm betreffen, nicht beachtet.

1.2. Aufbau der somatischen Bewegungsmuskulatur und der viszerale Mitteldarm-Muskeln

Die somatische Körperwandmuskulatur, die der Fortbewegung der *Drosophila*-Larven dient, ist in jedem abdominalen Hemisegment nach einem streng stereotypen Muster aufgebaut. Die jeweils 30 dorsalen, dorsolateralen, lateralen, ventrolateralen und ventralen Muskeln sind dabei vor allem durch ihre spezifische Größe und Verankerungsposition an der Epidermis gekennzeichnet (Bate, 1993; Paululat et al., Übersichtsartikel 1999). Es handelt sich um massive Syncytien, deren Kerne ähnlich wie

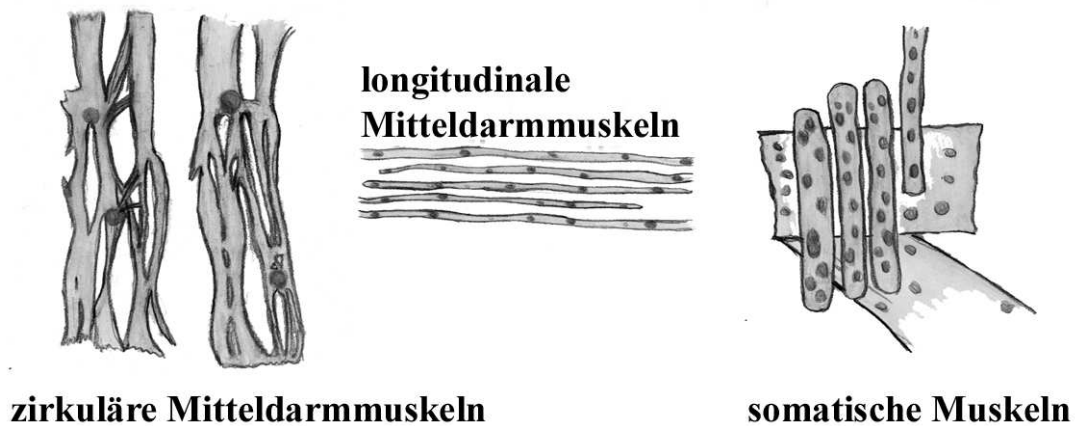


Abbildung 1.2.: Schema der viszeralen Mitteldarm-Muskeln und der somatischen Körperwandmuskeln (aus Schröter et al., 2006)

bei den Myofibrillen der Wirbeltiere in der Peripherie des Muskels lokalisiert sind, während der Muskel selbst zu größten Teil in charakteristischer Weise aus Sarkomereinheiten bestehen.

Die viszeralen Mitteldarmmuskeln bestehen wiederum aus zwei ihrem Bau nach unterschiedlichen Muskel-Arten. Während die longitudinalen Muskeln ähnlich den somatischen Bewegungsmuskeln als massive Syncytien erscheinen, haben die zirkulären Muskeln eine später im Ergebnisteil dieser Arbeit beschriebene einzigartige netzförmige Gestalt. Diese fällt bereits bei der Betrachtung früherer Arbeiten auf (z.B. Klapper et al., 2002; Fig. 1 D), wurde jedoch bisher nie explizit beschrieben. Als weiteres Unterscheidungsmerkmal enthalten die longitudinalen Muskeln bis zu sechs Kerne, die in einer langen, sich über den gesamten Muskel erstreckenden Reihe angeordnet sind (San Martin et al., 2001; Klapper et al., 2002). Die zirkulären Muskeln sind dagegen stets zweikernig (Klapper et al., 2002), und jeweils zwei dieser zirkulären Muskeln bilden spangenförmig einen Ring, der wie ein Fassreifen den Mitteldarm umspannt. Die relative Lage der zirkulären und longitudinalen Muskeln zueinander ist in der Literatur widersprüchlich beschrieben. Während ältere Arbeiten beschreiben, dass eine innere Schicht longitudinalen Muskeln von einer äusseren Schicht zirkulärer Muskeln bedeckt ist, sehen neuere Arbeiten die Situation genau umgekehrt und gehen von einer inneren Schicht zirkulärer Muskeln, die von einer äusseren Schicht longitudinaler Muskeln bedeckt ist, aus (Strasburger, 1932; Strasburger, 1935; Bodenstein, 1950; Miller, 1950; Poulson, 1950; Sandborn et al., 1965;

Goldstein and Burdett, 1971; Elder, 1975; Bate, 1993; Tepass and Hartenstein, 1994; Klapper, 2000).

Während die somatischen Muskeln unter anderem mit Hilfe von Integrinen an der Epidermis und die longitudinalen Muskeln am Mitteldarm-Epithel verankert sind (Brown et al., 2000), dienen sich die Ringmuskeln jeweils gemeinsam mit ihrem gegenüberliegenden Partner selbst als Gegenkraft und erscheinen nicht am Darmpithel befestigt.

2. Die somatische Körperwand-Muskulatur von *Drosophila melanogaster* entwickelt sich durch multiple Zell-Zell-Fusionen aus dem somatischen Mesoderm und ist an der Epidermis verankert

Aus den Arbeiten, die seit etwa 1990 veröffentlicht wurden, ergibt sich inzwischen ein recht kompaktes Bild der somatischen Myogenese, obwohl über den eigentlichen molekularen Ablauf der Myoblastenfusion selbst bisher wenig bekannt ist. Das daran beteiligte somatische Mesoderm entspricht der Somatopleura der Wirbeltiere und entsteht bei der Differenzierung des Mesoderms ab dem Stadium 9 unter Einwirkung verschiedener intrinsischer und extrinsischer Faktoren als anterior-ventraler Teil des jeweils in einem Parasegment lokalisierten Mesodermkompartimentes.

Nach der durch die früh-zygotischen Gene *twist* und *snail* in Abhängigkeit von der Konzentration des Transkriptionsfaktors Dorsal gesteuerten Determination des auf der ventralen Seite des Embryos im Blastoderm lokalisierten präsumptiven Mesoderms (Ip et al., 1992; Leptin et al., 1992; Reuter und Leptin, 1994; Thisse und Thisse, 1992), kommt es zur Invagination des Mesoderms während der Gastrulation. Die eingestülpten Mesoderm-Zellen verlieren ihren epithelialen Charakter, wandern - unter anderem abhängig von der Aktivität des FGF-Rezeptors *heartless* (*htl*) (Beimann et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Shishido et al., 1993 und 1997) - innerhalb des Embryos dorsalwärts und bilden dabei einen sogenannten Monolayer der in Kontakt mit dem Ektoderm steht (Leptin und Grunewald, 1990; Leptin et al., 1992). Im Anschluss daran wird das Mesoderm in jedem Parasegment in vier Kompartimente unterteilt, die Ursprung für das Herz, den Fettkörper, die somatische und die viszerale Muskulatur sind.

Die dorsoventrale Unterteilung des Mesoderms wird dabei zum einen durch unterschiedlich hohe Level der *twist*-Expression, sowie durch die Expression der Twist-Zielgene *tinman* (*tin*) und *D-mef2* (Azpiazu und Frasch, 1993; Baylies und Bate, 1996; Bodmer, 1993; Bour et al., 1995), zum anderen durch ektodermale Signale (Baker und Schubiger, 1995) gesteuert. So ist Decapentaplegic (Dpp) ein ektodermales Mitglied der TGF- β -Familie verantwortlich für ein Signal, das in dorsalen Mesoderm-

Zellen zur Aufrechterhaltung der *tinman*-Expression (Frasch, 1995) führt. Während in der so charakterisierten *tin*-positiven Domäne das viszerale Mesoderm und das Herz entstehen (Lockwood und Bodmer, 2002), resultieren das somatische Mesoderm und der Fettkörper aus der ventralen, mit niedriger *twist*-Konzentration ausgestatteten Domäne (Übersichtsartikel: Michelson, 1996; Taylor, 1996). Entlang der anterioposterioren Achse erfolgt die Unterteilung des Mesoderms unter dem Einfluss der intrinsisch exprimierten Paarregelgene *evenskipped* (*eve*) und *sloppy-paired* (*slp*) (Azpiazu et al., 1996; Riechman et al., 1997) sowie durch die Kontrolle der extrinsisch im Ektoderm exprimierten Segmentpolaritätsgene *hedgehog* (*hh*), *wingless* (*wg*) und *engrailed* (*en*) (Baylies et al., Übersichtsartikel 1998). In letzter Konsequenz werden durch diese Signale im posterioren Mesoderm-Kompartiment dorsal *bagpipe* und ventral *serpent* aktiviert, während *wg* diese im anterioren Kompartiment reprimiert (Azpiazu und Frasch, 1993; Hayes et al., 2001; Lee und Frasch, 2000; Riechmann et al., 1998). Auf diese Weise entstehen in jedem Parasegment vier durch differenzielle Genaktivität gekennzeichnete Mesoderm-Kompartimente: das anterior-dorsale Herz-Mesoderm, das posterior-dorsale viszerale Mesoderm, das anterior-ventrale somatische Mesoderm und das posterior-ventrale Fettkörper-Mesoderm.

2.1. Durch laterale Inhibition werden im somatischen Mesoderm Muskel-Progenitor-Zellen und in der Folge Muskel-Founder-Zellen und fusionskompetente Myoblasten gebildet

Die Entwicklung der somatischen Muskeln aus dem somatischen Mesoderm nimmt ihren Anfang mit der Segregation der sogenannten Muskel-Progenitor-Zellen in der oben charakterisierten high-*twist*-Domäne des Mesoderms (Nose et al., 1998). Diesem Prozess geht die Expression des proneuralen Gens *lethal of scute* (*l'sc*) im somatischen Mesoderm voraus. Unter Beteiligung von Notch, Delta und Enhancer of Split werden durch laterale Inhibition in verschiedenen *l'sc*-positiven Zell-Clustern einzelne Zellen bestimmt, die zu den Progenitor-Zellen werden, während die sie umgebenden Zellen zu fusionskompetente Myoblasten werden (Carmena et al., 1995; Carmena et al., 1998; Giebel, 1999). In der Folge teilen sich die Progenitor-Zellen noch einmal asymmetrisch wodurch zwei individuelle Muskel-Founder-Zellen, bzw. eine Muskel-Founder-Zelle und eine Vorläufer-Zelle für die adulte Muskulatur, ent-

stehen. Diese sind durch die spezifische Expression von Identitäts-Genen wie z.B. *S59*, *evenskipped* (*eve*), *krüppel* (*kr*), *msh*, *nautilus* und *ladybird* charakterisiert (Abmayr und Keller, Übersichtsartikel 1998; Dohrmann et al., 1990; Gaul et al., 1987; Frasch et al., 1987; Jagla et al., 1997, 1998; Michelson et al., 1990; Ruiz-Gomez et al., 1997; Paululat et al., Übersichtsartikel 1999a). Im Gegensatz dazu sind die fusionskompetenten Myoblasten zunächst durch die Expression des zur Gli-Superfamilie gehörenden Transkriptionsfaktors *Lame duck*/Myoblast incompetent (*Lmd*/*Minc*) eindeutig identifizierbar (Duan et al., 2001; Ruiz-Gomez et al., 2002). Erst nach der Fusion mit einer der Muskel-Founder-Zellen oder einer Muskelvorläufer-Zelle exprimieren auch die Kerne der vormaligen fusionskompetenten Myoblasten das jeweilige muskelspezifische Set von Identitäts-Genen.

2.2. Die Founder-Zellen fusionieren mit mehreren fusionskompetenten Myoblasten zu einem vielkernigen Muskel-Synzytium

Nach ihrer Determination ist jede Founder-Zelle mit spezifischen Informationen über die Position, Größe, Orientierung und Anheftung des von ihr zu bildenden Muskels ausgestattet (Baylies et al., Übersichtsartikel 1998; Paululat et al., Übersichtsartikel 1999a und 1999b) und beginnt nun mit den umliegenden fusionskompetenten Myoblasten zu einem vielkernigen Muskel-Synzytium zu fusionieren. Der initiale Schritt ist dabei die Zell-Zell-Erkennung gefolgt von der Zell-Adhäsion und der Zell-Zell-Fusion (vgl. 6). Sowohl für *Drosophila* als auch für die Vertebraten wird dabei ein Zwei-Stufen-Mechanismus diskutiert, bei dem zunächst zwei bis drei Fusionen stattfinden, die zur Bildung der Muskel-Vorläufer-Zelle führen (Rau et al., 2001). Im Anschluss daran findet eine zweite Welle von Fusionen zwischen der Muskel-Vorläufer-Zelle und weiteren fusionskompetenten Myoblasten statt bis die finale, muskelspezifische Kernanzahl erreicht ist (Frasch und Leptin, 2000, Paululat et al., 1999b, Horsley et al., 2003; Pavlat und Horsley 2003).

2.2.1. Ultrastrukturelle Merkmale im Verlauf der somatischen Myoblastenfusion (Doberstein et al., 1997)

In einer grundlegenden Arbeit wurden 1997 von Doberstein et al. mehrere, im Transmissions-Elektronen-Mikroskop sichtbare, ultrastrukturelle Merkmale der somatischen Myoblastenfusion beschrieben. So wurde nach der initialen Zell-Zell-Erkennung

beobachtet, dass es an den Stellen des Zell-Zell-Kontaktes in beiden Zellen zu einer Anhäufung von bis zu 50 elektronendichten Vesikeln kommt, die sich paarweise gegenüber anordnen und dadurch den sogenannte Präfusionskomplex bilden. Dieser ist neben den paarigen Vesikeln durch elektronendichte Verbindungen, die den interzellulären Spalt durchspannen charakterisiert. In der Folge wird der Präfusionskomplex von sogenannten elektronendichten Plaques abgelöst. In deren Nachbarschaft kommt es zum Membranzusammenbruch, wodurch die Zellen schließlich mit einander fusionieren.

Bis zum Beginn der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen war unklar, ob diese Merkmale in beiden potentiellen Fusionschritten auftreten oder ob sie gegebenenfalls auf einen der beiden beschränkt sind. Ferner war fraglich, ob es sich in der Tat um zwei distinkt getrennte Fusionschritte handelt. Auch die Zuordnung zu lichtmikroskopisch beobachtbaren Vorkommnissen der Myoblastenfusion war zunächst unklar, hierzu wurden jedoch inzwischen Ansätze für eine erklärende Theorie gefunden (Kesper, 2005 Dissertation, siehe 6.3: Die Fusionskomplex-Theorie).

2.2.2. Proteine, die an der somatischen Myoblastenfusion beteiligt sind

Vor allem die Analyse von Funktionsverlust-Mutanten hat in den vergangenen Jahren mehrere, offensichtlich an der somatischen Myoblastenfusion essentiell beteiligte Gene aufgedeckt (zusammengestellt in Tabelle 2.1). Für einige dieser Gene konnte eine mit einer der oben beschriebenen Ultrastrukturen korrelierte Funktion bestimmt werden, für andere bleibt dies zum momentanen Zeitpunkt offen (Übersichtsartikel: Abmayr et al., 2005; Chen und Olson, 2004; Dworak und Sink, 2002; Taylor, 2002; Paululat et al., 1999b).

Der Zell-Zell-Kontakt zwischen der Muskel-Founder-Zelle und den fusionskompetenten Myoblasten, sowie zwischen dem Muskelvorläufer und weiteren fusionskompetenten Myoblasten wird durch verschiedenen der Immunglobulin-G-Superfamilie zugehörige Transmembranproteine vermittelt. So exprimieren die Muskel-Founder-Zellen ebenso wie später die Muskelvorläufer das über fünf extrazelluläre Ig-Domänen verfügende Protein Dumbfounded/Kin of irregular chiasm C (Duf/KirreC)(Ruiz-Gomez et al., 2000), während die fusionskompetenten Myoblasten Sticks and stones (Sns), das über acht extrazelluläre Ig-Domänen verfügt, exprimieren (Bour et al.

Tabelle 2.1.: **Proteine, die für die Myoblastenfusion essentiell sind**

verändert nach Chen und Olson, 2004. ap-Dom. = Autophosphorylierungs-Domäne, TM = Transmembran-Domäne, F = Founder-Zelle, FCM = fusionskompetente Myoblaste, PTK = zytoplasmatische Protein Tyrosin Kinase

Protein	Expression	strukturelle Merkmale
Transmembran-Proteine		
Dumbfounded/Kin of irregular chiasm C (Duf/KirreC)	F	IG-Domänen, TM, ap-Dom., PDZ-Bindemotiv
Roughest/Irregular chiasm C (Rst/IrresC)	F, fM	IG-Domänen, TM, ap-Dom., PDZ-Bindemotiv
Sticks and stones (Sns)	FCM	IG-Domänen, Fibronectin-III-Domäne, TM, verschiedene Substratmotive für PTKs
Hibris (Hbs)	FCM	IG-Domänen, Fibronectin-III-Domäne, TM, verschiedene Substratmotive für PTKs
Intrazelluläre Proteine		
Rolling pebbles (Rols7)	F	Ankyrin-Repeats, RING-Finger-Domäne, TPR-Repeats
Schizo/Loner	F	IQ-Motiv, Sec7-Domäne, PH-Domäne, Coiled-coil-Domäne
Myoblast city (Mbc)	F, FCM	SH3-Domäne, Crk-Bindemotive, Docker-Domäne
DCrk	Mesoderm	SH2-Domäne, SH3-Domänen
Drac1 und Drac2	Mesoderm	GTPase
dARF6	ubiquitär	GTPase
DTitin	F, FCM	IG-Domänen, Fibronectin-III-Domänen, PEVK-Domäne
Blown fuse	FCM	PH-Domäne, Bindemotive für SH2- und SH3-Domänen
Kette	F, FCM	Aktin-Regulator

2000). Die intrazelluläre Domäne beider Proteine ist jeweils nicht weiter charakterisiert, sie spielen jedoch vermutlich beide eine wichtige Rolle bei der weiteren zur

Myoblastenfusion führenden Signaltransduktion. Aus Zellkultur-Experimenten gibt es Hinweise darauf, dass Duf und Sns direkt mit einander interagieren und so die Adhäsion zwischen zwei Zellen moderieren können (Dworak et al., 2001; Dworak und Sink, 2002). *In vivo* wurde jedoch gezeigt, dass mindestens ein weiteres Ig-Domänen-Protein mit funktioneller Redundanz zu Duf/KirreC, nämlich Roughest/Irregular chiasm C (Rst/IrreC), an der Etablierung des Zell-Zell-Kontaktes zwischen Muskel-Founder- bzw. Muskelvorläufer-Zelle und fusionskompetenter Myoblaste beteiligt ist. Im Gegensatz zu Duf, dessen mesodermale Expression auf die Founder-Zellen beschränkt ist, wird Rst sowohl in Founder-Zellen als auch in fusionskompetenten Myoblasten exprimiert. Die funktionelle Redundanz zwischen beiden tritt vor allem bei der Analyse von Funktionsverlustmutanten zu Tage. So zeigen weder *duf*- noch *rst*-mutante Embryonen eine Störung der Myoblastenfusion. In *duf*-/*rst*-Doppelmutanten kommt es jedoch zu einem kompletten Stopp der Fusion. Der hervorgerufene Phänotyp ähnelt dem Phänotyp, der in gewissen *sns*-Funktionsverlustmutanten zu beobachten ist: Die fusionskompetenten Myoblasten bilden wie die wildtypischen Zellen auch Filopodien, um mit den Founder-Zellen in Kontakt zu treten. Diese Filopodien besitzen jedoch im Kontrast zum Wildtyp eine rein zufällige Orientierung und sind nicht in der Lage, einen stabilen Kontakt mit der korrespondierenden Founder-Zelle herzustellen (Abmayr et al., 2003; Bour et al., 2000; Ruiz-Gomez et al., 2000). In diesem Kontext muss jedoch auch erwähnt werden, dass das schwache Allel *sns*¹⁵ nicht zum totalen Stopp der Fusion während der Zell-Zell-Erkennung führt, sondern es werden sogar elektronendichte Plaques beobachtet. Diese sind jedoch im Vergleich zum Wildtyp deutlich elongiert (Doberstein et al., 1997). Dies bestätigt, dass nicht nur Duf und Rst, sondern auch Sns während der gesamten Myoblastenfusion exprimiert sind. Das Sns-Paralog Hibris (Hbs) ist ebenfalls in seiner Expression auf die fusionskompetenten Myoblasten beschränkt. Seine Funktion in Bezug auf die Myoblastenfusion ist bislang unklar. Zwar ist bekannt, dass es in der Lage ist die Funktion von Sns zu inhibieren, so führt eine Überexpression von Hibris zum Stopp der Myoblastenfusion, ein Funktionsverlust führt aber nur zu geringen Defekten in der Myogenese (Artero et al., 2001).

Nach der Zell-Zell-Erkennung kommt es sowohl in den Founder-Zellen als auch in den fusionskompetenten Myoblasten zur Signaltransduktion und schließlich zur Aktivierung des Zytoskelettes das für den anstehenden morphologischen Umbau der Zelle

dringend benötigt wird. In den Founder-Zellen bzw. Muskelvorläufer-Zellen wird dazu das Produkt Rols7 des Gens *rolling pebbles* benötigt. 2001 wurde von Rau et al. gezeigt, dass Embryonen mit einem *rols7*-Funktionsverlust in der Lage sind, dreikernige Muskelvorläufer zu bilden. Dies legt nahe, dass Rols7 entweder nur für die Rekrutierung der fusionskompetenten Myoblasten der zweiten Fusionswelle essentiell ist oder dass möglicherweise ein redundant wirkendes Protein vorhanden ist. Ein solches konnte jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurde 2005 von Menon et al. gezeigt, dass zwischen Rols7 und Duf ein positiver Feedback-Loop besteht, der auf das durch die heterophile Duf-Sns-Interaktion getriggerte Signal hin eine Translokation des cytoplasmatischen Rols-Proteins zu der Stelle der Membran, an der Duf bereits vorhanden ist, bewirkt. In der Konsequenz wird die Expression von Duf aufrechterhalten, was die Intensivierung des Duf-Sns-Kontaktes und weitere Rols-Translokationen bewirkt. Dies steht im Einklang mit folgenden Beobachtungen: Zum einen kann Rols sowohl über seine TPR-Repeats als auch mit Hilfe der RING-Finger-Domäne physikalisch mit der cytoplasmatischen Domäne von Duf interagieren (Falco Kurtz, Diplomarbeit 2003; Nina Reichert, Diplomarbeit 2004), zum anderen ist in *duf-rst*-Doppelmutanten Rols7 nicht mehr wie im Wildtyp an der Zellmembran, sondern im Cytoplasma lokalisiert (Chen und Olson, 2001). Neben der Interaktion mit Duf, ist auch eine Interaktion mit Myoblast city (Mbc)(s. u.) beschrieben.

Ebenfalls auf die Founder-Zellen beschränkt ist der Guanin-nucleotide-Exchange-Factor (GEF) Schizo/Loner (Chen et al., 2003), der zunächst aufgrund von Defekten im ZNS identifiziert wurde (Hummel et al., 1999; Önel et al., 2004). Wie auch bei Rols7 ist die subzelluläre Lokalisation von Schizo an der Membran von Duf abhängig. Es besteht jedoch keine gegenseitige Abhängigkeit von Rols7 (Chen et al., 2003; Chen und Olson, 2004). Schizo enthält als funktionale Domänen sowohl eine Sec7-Domäne als auch eine PH-Domäne. Während die PH-Domäne möglicherweise für die subzelluläre Lokalisation des Proteins verantwortlich ist, wirkt die Sec7-Domäne in Form eines GEF auf die kleine GTPase dARF6 (Chen et al., 2003; Chardin et al., 1996; Donaldson und Jackson, 2000). In Funktionsverlustmutanten ist ein totaler Fusionsstopp zu Beginn der ersten Welle zu beobachten; es treten lediglich mononukleäre Minimuskeln auf.

Die Faktoren Myoblast city (Mbc), Rac1, Rac2, dARF6 und Crk treten sowohl in

den Founder-Zellen als auch in den fusionskompetenten Myoblasten auf (Dworak und Sink, 2004; Chen und Olson, 2004). Myoblast city (Mbc) ist homolog zum Wirbeltierprotein DOCK180 und zu Ced-5 aus *Caenorhabditis elegans* und verfügt über eine SH3-Domäne, mehrere Crk-Bindemotive und eine Docker-Domäne (Erickson et al., 1997; Nolan et al., 1998; Rushton et al., 1995). Aufgrund der Interaktion mit Mbc wurde 1999 das *Drosophila*-Protein Crk als homolog zum Wirbeltier-Protein CrkII identifiziert (Galetta et al., 1999; Nolan et al., 1998). Es handelt sich um ein SH2-SH3-Domänen-Adaptor-Protein, das sowohl in Wirbeltieren als auch in *C.elegans* in einer hochkonservierten Kaskade zusammen mit Mbc/DOCK180/Ced-5 agiert. Dabei bildet DOCK180 gemeinsam mit ELMO einen zweiteiligen GEF, der die Aktivität von Rac reguliert (Brugnera et al., 2002, Côté und Vuori, 2002; Guimienny et al., 2001; Kiyokawa et al., 1998). Durch die Interaktion mit Crk kann in diesem Kontext die subzelluläre Lokalisation des Komplexes gesteuert werden (Hamasaki et al., 1996; Hasegawa et al., 1996; Lamorte et al., 2003; Li et al., 2002; Li et al., 2003). Auch Rac1 und Rac2 sind für die somatische Myoblastenfusion notwendig, so findet in *rac1-rac2*-Doppelmutanten (Önel, mündliche Mitteilung) ebenso wie in *mbc*-mutanten Embryonen ein kompletter Stopp der Fusion, der maximal zu mononukleären Minimuskeln führt, statt; es muss daher von einer essentiellen Beteiligung am ersten Fusionsschritt ausgegangen werden. Neben einer Steuerung von Rac1 durch den Mbc-Crk-Komplex ist auch eine Kontrolle durch die Schizo-vermittelte Aktivität von Arf6 vorstellbar (Chavrier und Goud, 1999; Radhakrishna et al., 1996). In beiden Fällen werden jedoch vor allem Faktoren, die im Zusammenhang mit der Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes stehen, als weitere downstream-Effektoren von Rac diskutiert, so z.B. das auch mit Rols7 interagierende Protein D-Titin (Kreisköther et al., 2006; Machado et al., 2000; Zhang et al., 2000).

Schließlich ist das PH-Domänen-Protein Blown fuse (Blow) ein weiterer Faktor, der essentiell für die somatische Myoblastenfusion ist. Da ein Hauptfokus der vorliegenden Arbeit auf der Funktion dieses Proteins liegt, wird es in der Einleitung gesondert von den hier besprochenen Faktoren behandelt (s. 3, S. 28).

2.3. Die Anheftung der Synzytien an die Epidermis und der Aufbau des Sarkomers sind zum Teil von Faktoren abhängig, die auch die Myoblastenfusion steuern

Nach der Myoblastenfusion finden zwei weitere entscheidende Schritte zur Reifung der somatischen Muskeln statt. Einerseits wird das repetitive und streng geordnete Zytoskelett-Gerüst aufgebaut, das in Form des Sarkomers später die Kontraktion des Muskels erlaubt. Andererseits müssen die Muskeln über die sogenannten Muskel-Tendon-Zellen an der Epidermis, die als Gegenkraft zur Muskelkontraktion dient, verankert werden (Übersichtsartikel: Brown et al., 2000; Volk, 1999). Interessanterweise sind beide Prozesse unter anderem von Faktoren abhängig, die bereits für die Myoblastenfusion eine wichtige Rolle spielen. So sind neben Integrinen, die für die Anheftung der Muskeln essentiell sind (Brown et al., 2000), offensichtlich Dumbfounded und Roughest für die Etablierung des Zell-Kontaktes zwischen Myotube und Tendon-Zelle notwendig (Kreisköther et al., 2006; Strünkelnberg et al. 2001). Auch Titin ist nicht nur als Komponente des Fusionskomplexes (s.u.) an der Zell-Zell-Fusion beteiligt, sondern es ist auch ein wichtiger Bestandteil der im Verlauf der Myofibrillogenese gebildeten Z-Scheiben (Kreisköther et al., 2006). Schließlich wurde für verschiedene Rols7-Domänen eine individuelle Beteiligung an der Myoblastenfusion, der Myofibrillogenese und der Muskelanheftung gezeigt (Chen et al., 2005; Kreisköther et al., 2006): Während eine TPR E vermittelte Interaktion mit der intrazellulären Domäne von Duf für die Myoblastenfusion wichtig ist, ist eine Interaktion des RING-Fingers mit selbiger für die Muskelanheftung über die Tendon-Zellen notwendig. Weiterhin ist eine Interaktion der Rols7-TPR-Repeats und der RING-Finger-Domäne mit α -Actinin und Zormin, das von Titin abgeleitet ist, für die Myofibrillogenese sowie für die Muskelanheftung notwendig. Daneben scheint einer Interaktion von Rols7 mit Blown fuse (s.u.) bei der Muskel-Anheftung eine Rolle zu spielen (Falco Kurtz, Diplomarbeit 2003; Nina Reichert, Diplomarbeit 2004; Kreisköther et al., 2006).

3. Blown fuse als Faktor in der somatischen Myogenese

blown fuse (*blow*) wurde erstmals 1993 als *BB034* in einem mit Hilfe von EMS-Mutagenese durchgeführten Screen zur Aufdeckung von Motor-Axon-Defekten beschrieben (Van Vactor et al., 1993). Es ist allelisch zu *l(2)43Eb* (Heitzler et al., 1993), das aufgrund von Defekten des Peripheren Nervensystems im selben Screen entdeckt wurde. Dieser Phänotyp wird jedoch als sekundär angesehen, verursacht durch die Defekte des somatischen Mesoderms. Das Gen *blown fuse* ist an der cytologischen Position 43E auf dem zweiten Chromosom von *D. melanogaster* lokalisiert und umfasst vier Exons und drei Introns; die Analyse der Aminosäuresequenz sagt die Existenz einer PH-Domäne, die im vierten Exon codiert ist, vorher (Fly-Base)(Abb. 4.1). Es gibt neben dem Wildtyp-Allel zwei bekannte *blown fuse* Allele: Während *blow*² für eine Transkript und Protein-Null-Mutation codiert, sind in *blow*¹ normale Transkript- aber reduzierte Protein-Level zu beobachten (Doberstein et al., 1997).

Im Zuge der generellen Analyse der Myoblastenfusion haben Doberstein et al. 1997 *Blown fuse* als essentielle Komponente für das Fortschreiten der Fusion nach der Bildung des Präfusionskomplexes aus elektronendichten Vesikeln beschrieben. Darüberhinaus wird mit Hilfe eines Antikörpers eine Expression von *Blown fuse* im Mesoderm von Stadium 10 bis Stadium 14 gezeigt, es ist jedoch nicht zu erkennen, in welcher der Myoblastenpopulationen *Blown fuse* exprimiert wird. Da vor dem Stadium 10 kein Transkript nachgewiesen werden kann, ist davon auszugehen, dass keine maternale Komponente von *blow* vorliegt. Die licht- und elektronenmikroskopische Phänotyp-Analyse zeigt für beide Allele, *blow*¹ und *blow*² das identische Bild (Doberstein et al., 1997): Der Stopp auf der ultrastrukturellen Ebene erfolgt nach der Bildung des Präfusionskomplexes, was sich im Lichtmikroskop zunächst in einer Schar unfusionierter Myoblasten, die um Minimuskelgruppen gruppiert sind, äussert (Abb. 3.1, B, höhere Vergrößerung in D, Pfeil: unfusionierte Myoblasten). Dabei bleibt zunächst unklar, wieviele Kerne die Minimuskelgruppen beinhalten. In späteren Entwick-

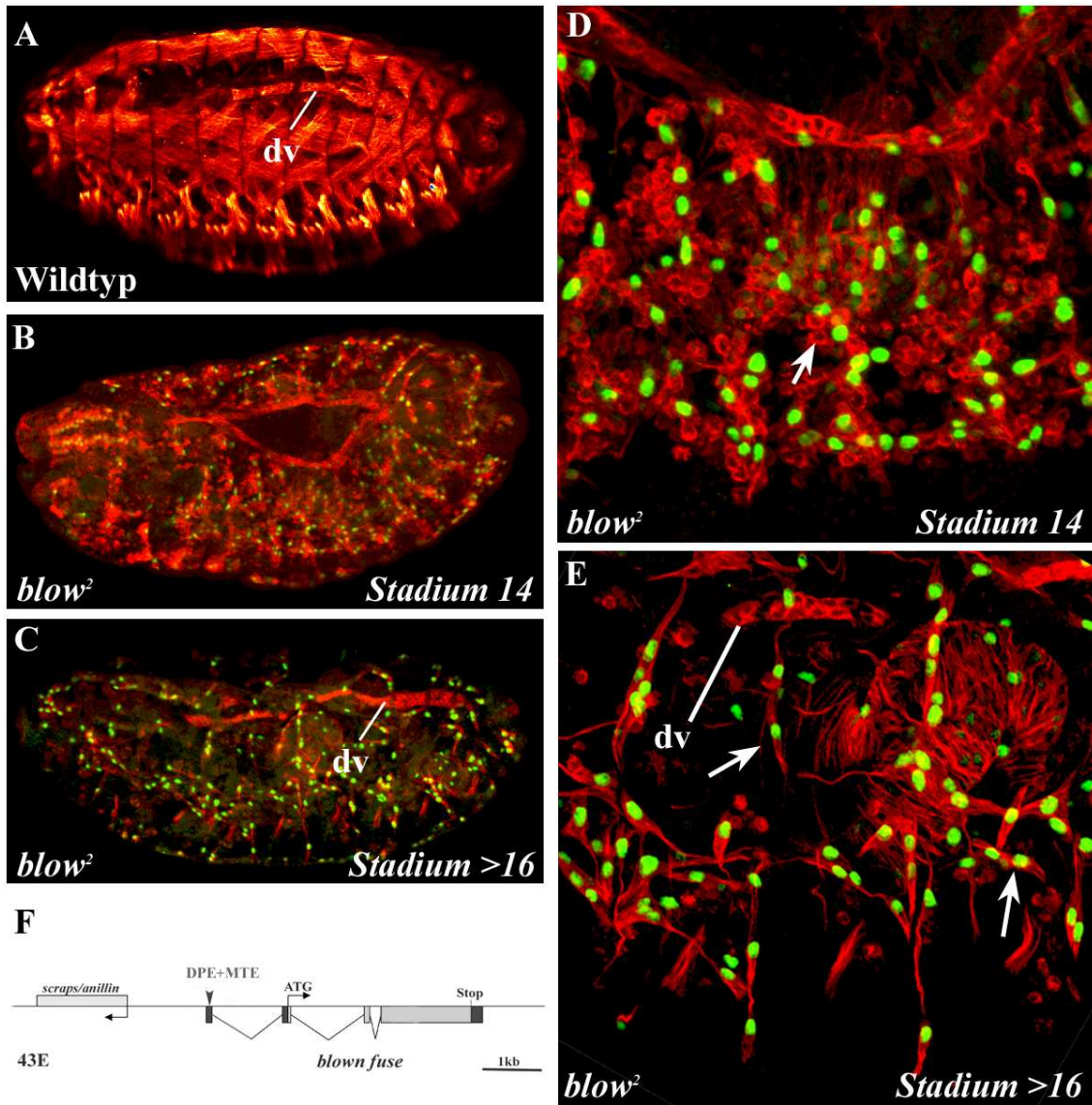


Abbildung 3.1.: *blow*-mutante Embryonen zeigen starke Defekte bei der Bildung der somatischen Muskulatur. **A** Wildtyp. **B-E** *blow*², Nachweis von β 3-Tubulin (rot) zur Markierung aller Myoblasten und β -Galactosidase (grün) zur Darstellung der Founder-Zellen. **B, D** Im Stadium 14 sind große Mengen unfusionierter Myoblasten (Pfeil) erkennbar. **C, E** Ab dem Stadium 16 haben Macrophagen die unfusionierten Myoblasten beseitigt; es bleiben die Minimuskeln (Pfeil) zurück, dv = Herz. **F** Schema des Genlokus von *blown fuse*.

lungsstadien werden die unfusionierten Myoblasten durch Macrophagen eliminiert und es bleiben die teilweise gestreckten Minimuskeln übrig (Abb. 3.1, C, höhere Vergrößerung in E, Pfeile: Minimuskeln). Das korrekt geschlossene Herz (Abb. 3.1, E dv) weist darauf hin, dass der Dorsalschluss korrekt stattfindet.

Im Rahmen der Suche nach an der Myoblastenfusion beteiligten Interaktionspartnern, wurde festgestellt, dass *Blown fuse* in der Lage ist mit dem durch *rolling pebbles*

codierten Rols⁷ physikalisch zu interagieren (Falco Kurtz, Diplomarbeit 2003; Nina Reichert, Diplomarbeit 2004; Kreisköther et al., 2006).

4. Der aus der Neurogenese bekannte Aktin-Regulator Kette/Hem2/Nap1 wird ebenfalls für die Myoblastenfusion benötigt

Auf der Suche nach weiteren an der somatischen Myoblastenfusion beteiligten Proteinen wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine Kollektion von *Drosophila*-Linien, die durch eine EMS-Mutagenese in der Arbeitsgruppe Klämbt der Universität Münster erzeugt wurden, mit Hilfe des Markers β 3-Tubulin nach auftretenden Fusionsdefekten durchmustert. Dabei wurden unter anderem mehrere Allele des Gens *kette* mit unterschiedlich starken Phänotypen gefunden (Anne Holz und Simone Lier, mündliche Mitteilung). So handelt es sich bei den Allelen *kette*^{C3-20} und *kette*^{J4-48} (Abb. 4.1), B und E, Pfeile: Minimuskeln) um durch das Erzeugen eines Stop-Codons entstandene Nullmutationen (Hummel et al., 2000), die durch das Auftreten großer Mengen unfusionierter Myoblasten, begleitet von Minimuskeln, charakterisiert sind. Dagegen führen die Allele *kette*^{G1-37} (Abb. 4.1, C und D, Pfeil: fehlorientierter Muskel) und *kette*^{J1-70} zum Funktionsverlust durch Aminosäure-Austausch (Hummel et al., 2000) und provozieren weniger starke Phänotypen mit einer höheren Anzahl fusionierter, wenn auch fehlorientierter Muskeln. Die molekulare Situation des phänotypisch hypomorphen Allels *kette*^{P168} ist bisher nicht geklärt.

Der Aktin-Regulator Kette wurde erstmals 1995 als Homolog zu den Wirbeltierproteinen Hem2 bzw. Nap1 beschrieben (Baumgartner et al., 1995). Auch in anderen Invertebraten ist Kette/Hem2/Nap1 vorhanden, so in *C.elegans* als GEX-3 (Soto et al., 2002). Während der Embryonalentwicklung ab dem Stadium 10 wurde Kette zunächst als essentiell für die Entwicklung des Zentralen Nervensystems, genauer als Faktor, der die Migrationsfähigkeit der Glia-Zellen des ZNS beeinflusst, beschrieben (Hummel et al., 1999; Hummel et al., 2000). Seine Funktion im ZNS wird dabei durch die physikalische Interaktion im Komplex mit Sra-1/PIR121/CYFIP und Abi gesteuert (Bogdan und Klämbt, 2003; Eden et al., 2002). Dieser Komplex reguliert die Aktivität von WASp und Scar/Wave, die wiederum als Regulatoren des Arp2/3-Komplexes die Polymerisation von F-Aktin steuern (Higgs und Pollard, 2001; Suetsugu et al., 2002; Takenawa und Miki, 2001). Während der Kette/Sra-

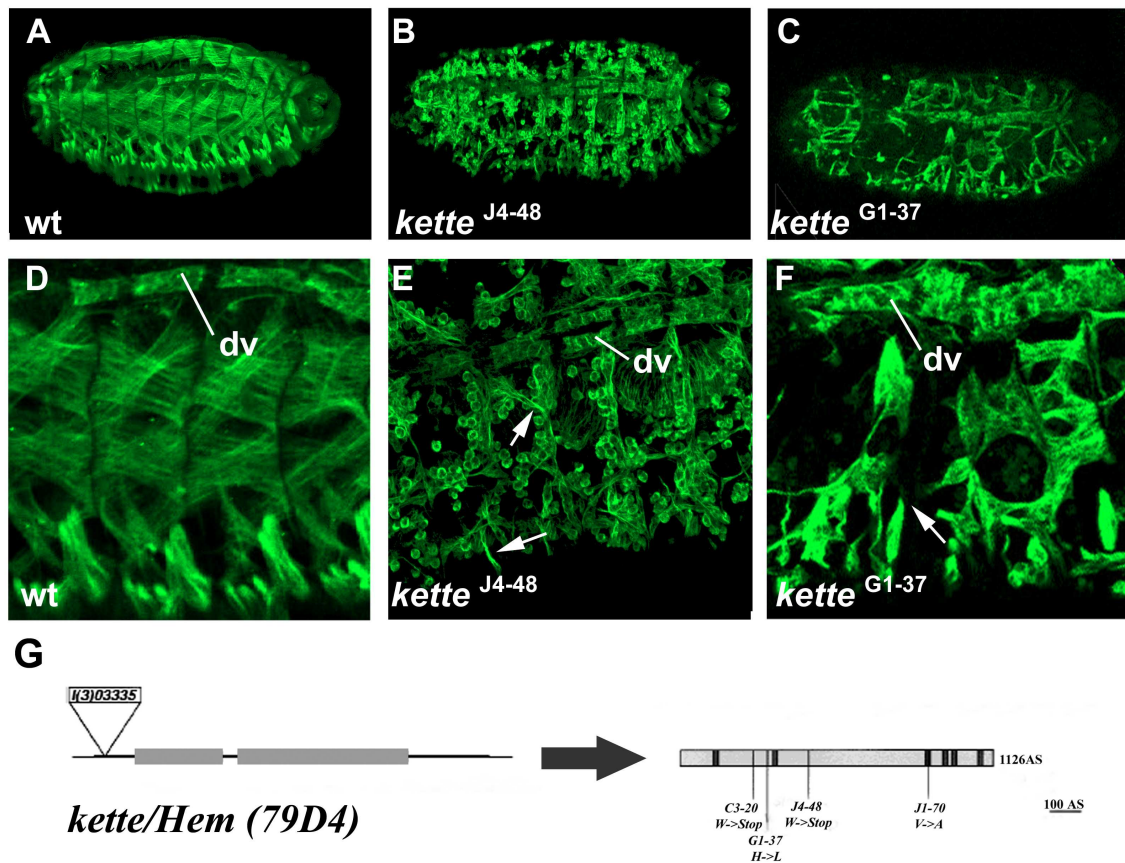


Abbildung 4.1.: *kette*-mutante Embryonen zeigen starke Defekte bei der Bildung der somatischen Muskulatur A-F β3-Tubulin-Nachweis. A, D Wildtyp . B, E amorphes Allel *kette*^{J4-48}. Die Pfeile in E weisen auf Minimuskeln, die von unfusionierten Myoblasten umgeben sind. C, F hypomorphes Allel *kette*^{G1-37}. Der Pfeil in F weist auf eine fehlerhaft orientierten Muskelspitze. G Schema des *kette*-Lokus und des Kette-Proteins. Durch EMS-Mutagenese wurden zwei Allele, die eine Stop-Mutation tragen (*kette*^{C3-20} und *kette*^{J4-48}) und zwei hypomorphe Allele mit einer Sinnänderung (*kette*^{G1-37} und *kette*^{J1-70}) erzeugt. (Verändert nach Hummel et al., 2000 und Schröter et al., 2004).

1/Abi-Komplex im Zytosol die Aktivität von Scar/Wave inhibiert, kommt an der Membran nach der Stimulation der Zelle durch ein externes Signal folgendes vereinfacht dargestelltes Szenario zu stande: Eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) erhält ein extrazelluläres Signal, was zur Autophosphorylierung führt. Das entstandene phosphorylierte Tyrosin, das in der intrazellulären Domäne der RTK lokalisiert ist, wird durch das SH2-SH3-Adaptorprotein Dreadlocks (Dock), das *Drosophila*-Homolog von Nck, erkannt und über sein SH2-Domäne gebunden. Die SH3-Domänen von Dock/Nck dienen dann als Anker-Station für verschiedene in die weitere Signaltransduktion involvierte Komponenten. So kann zum einen der autoinhibierte Fak-

tor WASp an die der SH2-Domäne benachbarte SH3-Domäne binden, während der Kette/Sra-1/Abi-Komplex an die C-terminale SH3-Domäne bindet. Eine durch Kette moderierte Interaktion von Abi und WASp kann daraufhin WASp aktivieren, was seinerseits zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes und zur Polymerisation von Aktin führt (Bogdan und Klämbt, 2003).

In beide Prozesse, die zytosolische Regulation von Scar und die membranständige Aktivierung von WASp, sind verschiedene GTPasen der Rho-Familie als Ko-Faktoren involviert. So bindet Sra-1 GTP-geladenes, also aktiviertes, Rac1, was dazu führt, dass die inhibitorische Funktion des Kette/Sra-1/Abi-Komplexes bezüglich Scar aufgehoben wird (Eden et al., 2002; Kobayashi et al., 1998; Miki et al., 2000). In der Konsequenz ist aktives Scar für die Aktinpolymerisation, die zur Bildung von Lamellipodien führt, verantwortlich (Bogdan et al., 2004; Kunda et al., 2003; Miki et al., 1998; Ridley, 2001; Rogers et al., 2003; Steffen et al., 2004). Die Aktivierung von WASp an der Membran ist dagegen nicht nur vom Kette/Sra-1/Abi-Komplex abhängig, sondern in manchen Fällen ausserdem von aktiviertem, also GTP-geladenen Cdc42 (Miki und Takenawa, 2003; Rohatgi et al., 1999). Anstelle von Lamellipodien werden auf dieses Signal hin Filopodien gebildet (Hall et al., 1998).

5. Die Founder-Zell-Hypothese trifft auch für die viszerale Mitteldarm-Muskeln zu

Im Gegensatz zur Entwicklung der somatischen Körperwand-Muskulatur ist über die Entwicklung der zirkulären und longitudinalen Mitteldarm-Muskeln nur wenig bekannt. So konnte erst ab 2000 mit Hilfe eines Transplantationsverfahrens bzw. mit Hilfe von Farbinjektionen gezeigt werden, dass es sich entgegen früherer Annahmen (Elder, 1975) ebenfalls um synzytiale Muskeln handelt (Klapper, 2000; Klapper et al., 2001 und 2002; San Martin et al., 2001). Diese entstehen wie auch im somatischen Mesoderm durch die Fusion von Founder-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten (Klapper et al., 2002; San Martin et al., 2001), der genaue Fusionsmechanismus ist bisher jedoch unbekannt; seine morphologische Aufklärung ist unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

5.1. Die Founder-Zellen der Mitteldarm-Muskeln stammen aus verschiedenen Teilen des Mesoderms

Erstaunlicherweise wurde beobachtet, dass die Founder-Zellen der zirkulären und der longitudinalen Mitteldarm-Muskeln aus unterschiedlichen Teilen des Mesoderms entstammen. Während die zirkulären Founder-Zellen Derivate des lateralen Mesoderms sind, wandern die longitudinalen Founder-Zellen aus dem caudalen viszerale Mesoderm von der distalen Spitze des Keimstreifes her ein (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Georgias et al., 1997; Kusch und Reuter, 1999). Dabei teilen sie sich zunächst in zwei Gruppen auf jede Seite des Keimstreifens auf und wandern dann in jeweils zwei Reihen anteriorwärts, wobei die sich bildenden zirkulären Muskeln als Substrat dienen.

Die viszerale fusionskompetenten Myoblasten und die Founder-Zellen der zirkulären Mitteldarm-Muskeln entstammen dem durch die Expression von *bagpipe* charakterisierten posterior-dorsal gelegenen Mesodermkompartiment. Während dem Stadium 10 strecken sich die *bap*-positiven Zellcluster zu einem kontinuierlichen anterior-posterior elongierten Band aus viszerale Progenitor-Zellen. Die Determination der Founder-Zellen ist dann zum einen wie auch im somatischen Mesoderm von einer

Notch-Delta gesteuerten Signalkaskade abhängig (Carmena et al., 2002; Stute et al., 2004), zum anderen ist sind das vom somatischen Mesoderm sekretierte Protein Jelly belly (Jeb) und sein Rezeptor, die Rezeptortyrosinkinase Alk (Anaplastische Lymphom Kinase) notwendig (Englund et al., 2003; Lorén et al., 2001 und 2003; Stute et al., 2004). Sowohl der Ausfall von Notch als auch der Ausfall von Delta führt zu einem Überschuss an Founder-Zellen. Gleichzeitig ist im somatischen Mesoderm ein dramatischer Verlust der fusionskompetenten Myoblasten zu beobachten, der im viszerale Mesoderm schwächer ausfällt (Carmena et al., 2002). Im Gegensatz dazu fehlen in *jeb*- bzw. *Alk*-mutanten Embryonen die Founder-Zellen im viszerale Mesoderm und die fusionskompetenten Myoblasten des somatischen Mesoderms (Stute et al., 2004).

Ein Modell zur Determination der zirkulären Founder-Zellen und der viszerale fusionskompetenten Myoblasten geht von folgender Situation aus (Stute et al., 2004): Im Stadium 10 wird von bestimmten ventromedial gelegenen somatischen Zellen Jeb sekretiert (Weiss et al., 2001). Während wenige Zellen im somatischen Mesoderm zu diesem Zeitpunkt Alk exprimieren, ist die Rezeptortyrosinkinase in allen *bap*-positiven Zellen des viszerale Mesoderms vorhanden. Alk reagiert als Rezeptor für Jeb (Lorén et al., 2003) mit der Weiterleitung einer Signalkaskade, die das Founder-Zell-Schicksal der jeweiligen Zelle festlegt. Da das sekretierte Jeb-Protein zunächst nur die ventromedialste Reihe von viszerale Zellen erreicht, werden nur diese zu zirkulären Founder-Zellen; Zellen in denen der Jeb-Alk-vermittelte Signalweg nicht aktiviert wird, werden zu fusionskompetenten Myoblasten.

5.2. Die Zell-Zell-Erkennung bei der Bildung der zirkulären Mitteldarm-Muskeln wird durch Duf und Sns vermittelt

Wie auch im somatischen Mesoderm sind Dumbfounded und Sticks and stones essentiell für die Herstellung eines Zell-Zell-Kontaktes, der der Fusion der Myoblasten zu den zirkulären Mitteldarm-Muskeln vorausgeht (Klapper et al., 2002). Dies unterstützt die These, dass die Founder-Zell-Hypothese (Bate, 1993) auch für das viszerale Mesoderm zutrifft. So exprimieren auch hier Zellen, die als die viszerale Founder-Zellen angesehen werden, Duf, während die viszerale fusionskompetenten Myoblasten durch Sns gekennzeichnet sind. Darüberhinaus ist Fasciclin III (Patel et al., 1987) ein geeigneter Marker um alle Zellen des viszerale Mesoderms darzustellen.

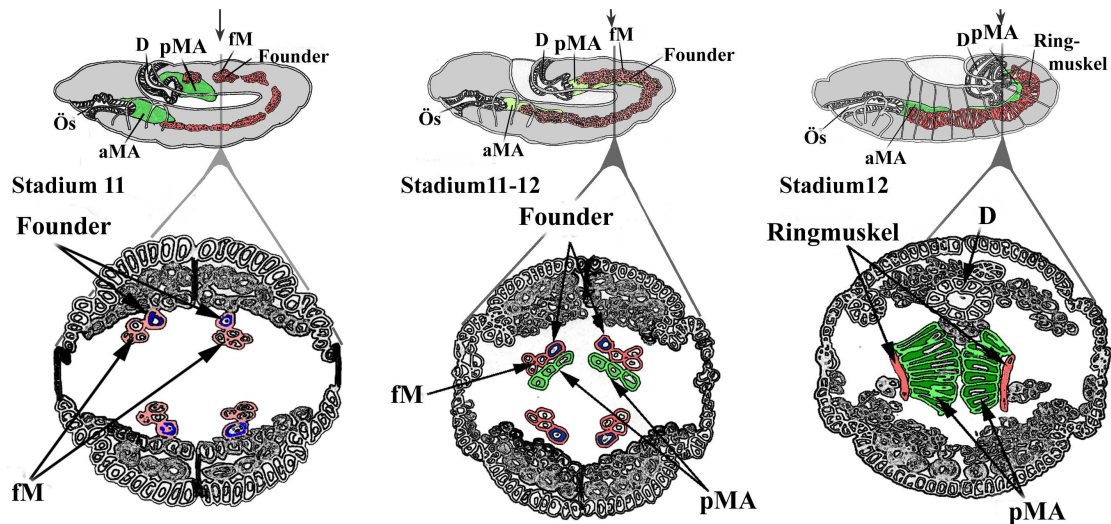


Abbildung 5.1.: Schema der Entwicklung der zirkulären viszerale Mitteldarm-Muskeln Die zirkulären viszerale Founder-Zellen und die viszerale fusionskompetenten Myoblasten sind anhand ihrer Position eindeutig zu identifizieren. Founder = Founder-Zelle, fM = fusionskompetente Myoblaste, D = Enddarm, pMA = posteriore Mitteldarm-Anlage, aMA = anteriore Mitteldarm-Anlage, Ös = Ösophagus. Die Pfeile weisen auf die Position der jeweils im Querschnitt dargestellten Ebene im Embryo (aus Schröter et al., 2006).

len. Dabei fällt auf, dass die Duf-positiven Founderzellen durch eine deutlich rechteckigere Form und eine stärkere FasIII-Expression als die globulären Sns-positiven fusionskompetenten Myoblasten gekennzeichnet sind. Ausserdem sind die Founder-Zellen anhand ihrer Lage im Embryo sowohl in der lateralen Ansicht als auch im Querschnitt gut zu identifizieren (Abb. 5.1). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Duf als auch Sns und Myoblast city für eine Fusion der zirkulären Founder-Zellen mit fusionskompetenten Zellen notwendig sind (Klapper et al., 2002). Dies legt eine gewisse Ähnlichkeit zur somatischen Myoblastenfusion nahe. Im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführte Studien zeigten, dass auch Blown fuse anscheinend eine Rolle bei der Entwicklung der zirkulären Mitteldarm-Muskeln spielt, ob diese jedoch die Fusion der Myoblasten betrifft blieb unklar (Schröter, Diplomarbeit 2003). Zu klären bleibt auch, welche anderen somatischen Faktoren möglicherweise eine Rolle spielen und ob mit der somatischen Fusion vergleichbare Ultrastrukturen, wie elektronendichte Vesikel und Plaques, auftreten.

6. Membranfusionen, die Immunologische Synapse und die Fusionskomplex-Theorie

Der wichtigste Schritt bei der Entwicklung der synzytialen Muskulatur von *Drosophila* ist die Fusion zweier oder mehrerer Zellen miteinander. Dabei kommt es zur kurzfristigen und partiellen Aufhebung des essentiellsten Merkmales einer lebenden Zelle: Der Integrität der die Zelle zur Aussenwelt hin abgrenzenden Zellmembran und die Vermischung des Zytoplasmas mit dem einer anderen Zelle. Dieser Prozess muss auf das genaueste räumlich und zeitlich kontrolliert werden, um Chaos-stiftende Effekte durch zufällige Zell-Fusionen zu vermeiden. Dabei kommt der gezielten Kontaktbildung zwischen den zu fusionierenden Zellen eine zentrale Bedeutung zu. Ein Beispiel der Herstellung eines spezifischen transienten interzellulären Kontaktes, ist die Bildung einer sogenannten Immunologischen Synapse zwischen einer T-Zelle und einer Antigen-Präsentierenden-Zelle (APC). In früheren Arbeiten wurde die Theorie aufgestellt, dass der Myoblastenfusion möglicherweise eine ähnliche Struktur vorausgeht (Kesper, 2005 Dissertation).

6.1. Membranfusionen und Zell-Zell-Fusionen

Das Auftreten von Membranfusionen ist zunächst nicht auf die Fusion zweier Zellen beschränkt. Vielmehr ist der häufigste Fall die intrazelluläre Fusion von Vesikeln innerhalb der Zelle mit anderen Zellkompartimenten. Daneben tritt ein weiterer wichtiger Fusionsprozess bei der Infektion einer Wirtszelle durch eine Virus-Zelle auf. Schließlich gibt es verschiedene eukaryotische Zelltypen, die mit einander fusionieren können, so z.B. Eizelle und Spermium aber auch Plazenta-Zellen, Osteoklasten, Epidermiszellen von Nematoden während der Bildung der Hypodermis, sowie Hefezellen beim sogenannten Mating und schließlich Myoblasten bei der Entwicklung der Muskeln oder beim Heilungsprozess nach einer Verletzung bzw. beim Training der Muskeln (Übersichtsartikel: Blumenthal et al., 2003; Chen und Olson, 2005; Jahn et al., 2003). Allen diesen Fusionsmechanismen ist der grundsätzliche Ablauf gemeinsam: Es kommt zur Adhäsion, gefolgt vom Alignment und der Vermischung der beiden Lipid-bilayer-Schichten, die die Membranen bilden. Schliesslich entsteht ei-

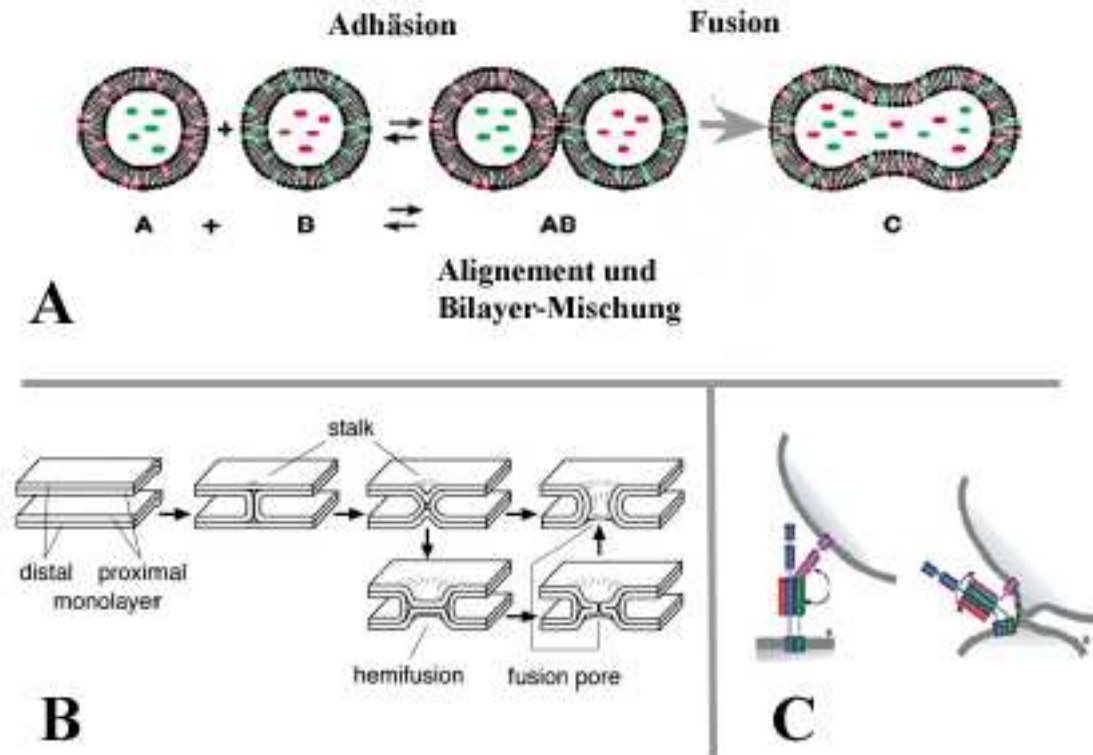


Abbildung 6.1.: A Schema der Fusion zweier durch Membranen abgeschlossener Kompartimente (verändert nach Blumenthal et al., 2003). *B* Membranfusionen zwischen Lipid-Bilayern, stalk-Hypothese (aus Jahn et al., 2003) *C* Durch eine Konformationsänderung fusionsvermittelnder Proteine hergestellter Membran-Kontakt zwischen membranabgeschlossenen Kompartimenten: Die fusionsvermittelnden Proteine, die in den Membranen der beiden zu fusionierenden Kompartimente lokalisiert sind (lila bzw. grün/blau) interagieren mit einander (Doppelpfeil) und ändern dann klappmesserartig ihre Konformation (aus Jahn et al., 2003).

ne durch eine kontinuierliche wässrige Phase gekennzeichnete Fusionspore (Abb. 6.1, A). In allen Fällen wird die dem Membrankontakt folgende Fusion durch sogenannte fusionsvermittelnde Proteine gesteuert. Das sind bei der intrazellulären Fusion verschiedene Varianten von membranständigen SNARE-Proteinen, so z.B. v-SNAREs und t-SNAREs (Bock et al. 2001; Übersichtsartikel: Chen und Scheller, 2001; Jahn und Südhof, 1999; Rizo und Südhof, 2002) und bei der Virus-Wirtszell-Fusion bestimmte Hüll-Proteine der Klasse I und II die für jeden Virus typisch sind (Eckert und Kim, 2001; Heinze und Allison, 2001; Skehel und Wiley, 2000). Bei der Zell-Zell-Fusion eukaryotischer Zellen sind ebenfalls spezielle membranständige Proteine involviert. In vielen Fällen handelt es sich dabei um Proteine der A-Disintegrin-And-Metalloprotease-(ADAM)-Familie (Huovila et al., 1996; Wolfsberg et al., 1995a

und 1995b). So moderiert das fertilin- α /fertilin- β -Heterodimer Fertilin, quasi der Prototyp der ADAMs-Proteine, die der Fusion zwischen dem Spermium und der Eizelle vorsausgehende Zelladhäsion (Blobel et al., 1992; Kaji, 2004; Primakoff et al., 1987), wohingegen Meltrin- α im Verdacht steht, an der Fusion von Wirbeltier-Myoblasten beteiligt zu sein (Yagami-Hiromasa et al., 1995). Andere eukaryotische fusionsvermittelnde Proteine sind z.B. das *C.elgans* Protein Eff-1, das die epidermale Zellfusion des Nematoden vermittelt (del Campo et al., 2005; Mohler et al., 2002; Shemer et al. 2004), oder das von einem humanen Retrovirus-Klasse I-Fusionsprotein abgeleitete Syncytin, das vermutlich die Trophoblastenfusion während der Bildung des Syncytiotrophoblasten bei der Einnistung des Säuger-Embryos in die Placenta steuert (Mi et al., 2000).

Um den physikalischen Ablauf der Fusion zweier Lipid-Bilayer-Membranen zu erklären, wurde die Stalk-Hypothese entwickelt (Kozlov und Markin, 1983; Chrenomordik et al., 1987). Sie geht davon aus, dass es zunächst zu einer Vermischung der proximalen Monolayer kommt, gefolgt von der stalk-Bildung. Dieses Stadium zeichnet sich dadurch aus, dass die proximalen Membranen so stark gekrümmt wurden, eventuell unter dem Einfluss der fusionsvermittelnden Proteine, dass sie eine kontinuierliche Membran bilden, während die distalen Membranen noch getrennt von einander sind. Über verschiedene theoretische Zwischenstadien, z.B. die Hemifusion, bei der die Zellen oder Kompartimente nur noch durch jeweils eine eigene Monolayer getrennt sind, öffnet sich dann die Fusionspore und es kann zur Vermischung der wässrigen Phasen der beiden Fusionspartner kommen (Abb. 6.1, B). Da dieses Hypothese jedoch an einigen Punkten von energetisch sehr ungünstigen Bedingungen ausgeht, ist fraglich, ob eine spontane und nicht moderierte Fusion auf diese Weise verlaufen muss (Siegel, 1993). Es wird daher vorausgesetzt, dass der energetische Level durch das Einwirken gewisser Proteine immer auf ein Minimum gesenkt werden muss. Dabei wird die Annäherung der zu fusionierenden Membranen jeweils durch eine gegenseitige Erkennung und Bindung der entsprechenden auf beiden Seiten vorhandenen Proteine vermittelt. Dies geschieht in dem die fusionsvermittelnden Proteine eine gewisse Konformationsänderung durchführen, die zu einer Verkürzung der Distanz zwischen den beteiligten Membranen führt (Klappmesser-Hypothese, Abb. 6.1, C).

6.2. Die Immunologische Synapse

Als Immunologische Synapse wird im Allgemeinen eine bestimmte Kontaktstruktur zwischen einer T-Zelle und einer Antigen-präsentierenden-Zelle (APC) bezeichnet. Dabei kann die molekulare Interaktionszone zwischen den beiden Zellen nach verschiedenen Konstruktionsprinzipien aufgebaut sein, so gibt es multizentrische, unsegregierte, secretorische, dynamische und monozentrische oder auch stabil genannte Immunologische Synapsen (Übersichtsartikel: Friedl et al., 2004 und 2005). Letztere zeichnet sich durch einen inneren (c-SMAC) und einen äusseren Supramolekularen activation cluster (p-SMAC) aus (Grakoui et al., 1999). Dabei ist im c-SMAC eine Anhäufung des T-Zell-Rezeptors (TCR) zu beobachten, während im p-SMAC Integrine dominieren (Abb. 6.2, A). Die Entwicklung einer stabilen Immunologischen Synapse besteht aus mehreren Phasen: Zuerst scannt die T-Zelle die APC nach geeigneten Antigenen, sind diese gefunden wird ein adhäsiver Kontakt unter Beteiligung der Integrine hergestellt. Dabei handelt es sich meistens um eine Erkennung von Antigen-MHC-Komplexen und ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1) durch den TCR (Dustin et al. 1997). Als nächstes wird eine sogenannte frühe Synapse etabliert, die erste Signale in das Zellinnere der beiden Partner sendet. Innerhalb der ersten Sekunden nach dem Kontakt kommt es zu Calcium-vermittelten Signalen, die Signalmoleküle wie CD3 ζ , LCK, ZAP70 und PI3K zur Synapse rekrutieren (Donnadieu et al., 1992; Freiberg et al., 2002; Gunzer et al., 2000; Huppa et al.,

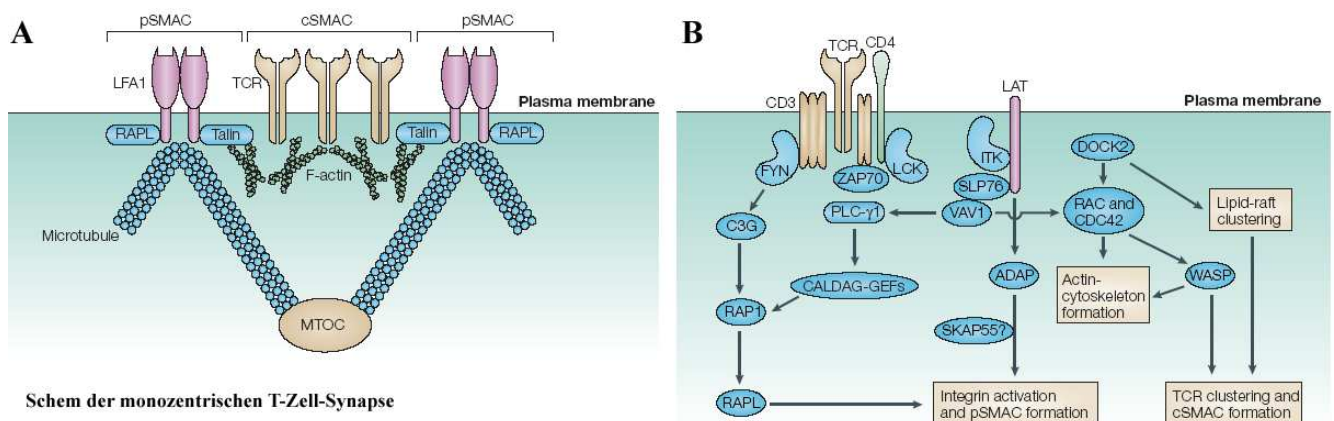


Abbildung 6.2.: Schema der monozentrischen T-Zell-Synapse. **A** Prinzipieller Aufbau aus TCR enthaltendem, F-Aktin-stabilisiertem cSMAC und Integrin enthaltendem, Mikrotubuli-stabilisiertem pSMAC. **B** Signalkaskaden, die nach dem ersten Calcium-abhängigen Signal der Synapse in der T-Zelle ablaufen. (aus Kinashi, 2005).

2003; Negulescu et al., 1996)(Abb. 6.2, B). ZAP70, dessen *Drosophila*-Homolog, die zytoplasmatische Tyrosin-Kinase Shark ist, phosphoryliert in der Folge LAT (Linker for activation of T-Cells), das daraufhin wiederum von verschiedenen SH2-Domänen enthaltenden downstream-Effektoren gebunden werden kann. Dies schließt eine Reihe von Proteinen ein, die als Antwort ein Rearrangement des Aktin-Zytoskelettes bewirken, so z.B. SLP76, das mit Vav1 interagiert, was schließlich zur Aktivierung von Rac und Cdc42 und in der Folge zur Aktivierung von WASp führt (Badour et al., 2003; Snapper et al., 1999). Dies führt zum Aufbau des cSMAC durch eine Clusterung des TCR und die Stabilisierung durch das Aktin-Zytoskelett. Ausserdem können auf diese Weise unter dem Einfluss von Skap-55 Lipid Rafts zur Kontaktstelle dirigiert werden (Wu et al., 2002). Gleichzeitig ist LAT über SLP76, ADAP und Skap55 in die Aktivierung und den Zytoskelett gestützten Transport von Integrinen, wie z.B. LFA-1, zum sich bildenden pSMAC involviert (Monks et al., 1998; Rudd und Wang, 2003).

Nach der so gesteuerten Reifung der Immunologischen Synapse wird nach einer Weile der TCR von der T-Zelle internalisiert und schließlich der Kontakt wieder gelöst. Auffällig ist, dass es sich bei der Etablierung der Immunologischen Synapse um einen unsymmetrischen Prozess handelt, so erfolgt die starke Polarisierung des Aktin-Zytoskelettes ausschließlich in der T-Zelle (Penninger und Crabtree, 1999; Wülfing et al., 1998).

6.3. Die Fusionskomplex-Theorie

Die Fusionskomplex-Theorie geht davon aus, dass es bei der Myoblastenfusion von *Drosophila* vor der Vermittlung der Membranfusion zum Aufbau einer spezifischen Kontaktstruktur kommt, die sowohl Ähnlichkeiten mit einem Podosom, als auch mit der monozentrischen Immunologischen Synapse hat (Kesper, Dissertation 2005; Kesper et al., eingereicht). Sie basiert auf der Beobachtung, dass Rols7, Duf und Sns eine ringförmige Lokalisation an bzw. in der Membran von Founder- bzw. Muskelvorläufer-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten im Bereich des Kontaktes zwischen beiden zeigen. Dabei verfügt der Ring über einen Kern aus F-Aktin und mit Aktin-interagierenden Proteinen wie z.B. Titin. Sowohl der strukturelle Aufbau der monozentrischen Immunologischen Synapse (s.o.) als auch der eines Podosoms sind zweigeteilt und durch ihren Aktin-Kern ähnlich zu der beobachteten Organisation

der Myoblastenfusions-vermittelnden Proteine. Dabei besteht das Podosom aus einem inneren Kern aus F-Aktin und damit assoziierten Proteinen, wie α -Actinin, Cortactin, Gelsolin und WASp, während der äussere den Kern umgebende Ring Integrine und andere adhäsionsvermittelnden Proteinen wie Talin, Vinculin und interessanterweise das mit Crk interagierende und dessen Translokation zur Membran steuernde Paxillin enthält (Übersichtsartikel: Linder und Kopp, 2005). Daneben sind verschiedene ADAMs-Proteine mit Podosomen assoziiert (Abram et al., 2003; Johanson, 2004). Sofern die Strukturen in der Tat ähnlich sind, würde also die Subzelluläre Lokalisation von Rols7, Duf und Sns einer Position im pSMAC bzw. im Ring des Podosoms entsprechen. Es wird daher die Möglichkeit diskutiert, dass Duf und Sns hier die adhäsive Rolle von Integrinen übernehmen, da bisher keine Beteiligung von Integrinen, wie z.B. Myospheroid (Brown et al. 1994), an der Myoblastenfusion von *Drosophila* nachgewiesen werden konnte.

Eine Korrelation mit dieser zunächst als PILMAC (Podosomal and Immunological Synapse Like Myogenic Adhesive Complex) dann als FURMAC (Fusion Restricting Myogenic Adhesion Complex) bezeichneten Struktur mit den ultrastrukturellen Vorgängen bei der Myoblastenfusion führte schließlich zu folgender Hypothese: Nach dem initialen Zell-Zell-Kontakt wird der PILMAC etabliert und es kommt zur Rekrutierung des Präfusionskomplexes aus elektronendichten Vesikeln. Diese könnten exocytiert werden und so zur Verdichtung des FURMAC-Kernes führen, was im TEM als elektronendichte Plaques erscheint. Gleichzeitig sind im PILMAC-Ring noch elektronendichte Vesikel sichtbar. Während der Prozess fortschreitet, dehnt sich der FURMAC radiär aus, was zu einer symmetrischen Anordnung von äusseren elektronendichten Vesikeln und inneren elektronendichten Plaques führt. Innerhalb der elektronendichten Plaques kommt es zur Membranmischung, schließlich zur Fusion und zum Abbau überschüssigen Materials durch Vesikel, die ins Zell-Innere transportierte werden.

7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat drei hauptsächliche Schwerpunkte:

1. Die Analyse der wildtypischen Fusion der zirkulären viszeralen Founder-Zellen mit den viszeralen fusionskompetenten Myoblasten und die morphologische Überprüfung der Zwei-Schritt-Hypothese im somatischen Mesoderm. Mit dem Ziel eine Aussage über die Vergleichbarkeit der somatischen und der viszeralen Myogenese treffen zu können, soll als erstes geklärt werden, auf welche Weise die zirkulären Mitteldarm-Muskeln fusionieren. Insbesondere soll dabei festgestellt werden, ob die für die somatische Fusion charakteristischen ultrastrukturellen Merkmale auch bei der Fusion viszeraler Myoblasten auftreten. Dazu ist es allerdings notwendig, zunächst die Morphologie dieser Muskeln hinreichend detailliert zu beschreiben. Zweites soll festgestellt werden, ob die beschriebenen ultrastrukturellen Merkmale während der gesamten somatischen Myoblastenfusion vorkommen, oder ob sie auf einen der beiden möglichen Fusionsschritte beschränkt sind. Letzteres wäre ein definitiver Hinweis zur Bestätigung des Zwei-Schritt-Modelles.
2. Die Analyse der Beteiligung von *Blown fuse* und *Kette* an beiden zuvor untersuchten Mechanismen. Dazu soll zunächst geklärt werden, ob, wann und wo beide Proteine im Mesoderm exprimiert werden. Weiterhin soll festgestellt werden, in welcher Phase der somatischen Myoblastenfusion die Gene *blow* und *kette* benötigt werden und ob sie darüberhinaus eine Rolle bei der Entwicklung der zirkulären viszeralen Muskeln spielen.
3. Die Aufstellung einer Hypothese über die molekulare Funktion von *Blown fuse*. Während für *Kette*/Hem2/Nap1 bekannt ist, dass es sich um einen Regulator des Aktin-Zytoskelettes handelt, liegt die Funktion des PH-Domänen-Proteins *Blown fuse* bisher im Dunkeln. Um eine Hypothese darüber aufzustellen, soll zum einen eine *in-silico*-Analyse der Aminosäure-Sequenz durchgeführt, zum anderen nach orthologen Proteinen, deren Funktion bekannt ist, gesucht werden. Mit Hilfe der dabei gewonnenen Daten sollen nach Möglichkeit molekulare Partner von *Blown fuse* als Kandidaten für weitere an der Myoblastenfusion beteiligte Faktoren identifiziert werden.

Teil II.

Material und Methoden

8. Allgemeine Materialien

8.1. Laborgeräte

Tabelle 8.1.: **Mikroskope und Kameras**

Digitale Mikroskop Kamera	Polaroid DMC1, Polaroid DMC1 low-light und AxioCamMR (Zeiss)
Transmissions-Elektronenmikroskop	Hitachi
Raster-Elektronenmikroskop	Hitachi S-530
Konfokales Laserscan Mikroskop	TCSsp2 (Leica)
Axioplan 2-microscope	Zeiss, betrieben für Fluoreszenz mit FluoArc-Lampe
Stereomikroskop	Stemi SV, Zeiss

Tabelle 8.2.: **Geräte für die Mikroinjektion**

Kapillarzyehgerät	Vertical Pipette Puller 720, Kopf
Mikroinjektionsapparatur	5242 Hermle ZK401, Eppendorf
Mikromanipulator	Leitz

Tabelle 8.3.: **Geräte für die Molekularbiologie**

Elektrophoreseapparatur für Agarose-Gele	Werkstatt Universität Marburg
Elektrophoreseapparatur für Protein-Gele	peqlab, Erlangen
Kryobad	KH3, Biometra
Kühlzentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R Biofuge fresco, Heraeus
Magnetrührer	Mono, Variomag Monotherm, Variomag
pH-Meter	GPRT 1400 A, Greising electronic
Photometer	Ultraspec 300, Pharmacia Biotech
PCR-Thermoblock	Personal Cycler, Biometra
Schüttler	Rocky 3D Horizontalschüttler
Spannungsquelle	Power Pac 300, Biorad
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus
Thermoblock	HBT 130, HCL

Tabelle 8.3.: Geräte für die Molekularbiologie

Vakuum-Heiz-Zentrifuge	Univapo 100 H, Uniequip Martinsried
Vortex-Gerät	MAGV, Rabenau, Londorf
UV-Crosslinker	Ultralum, Electronic Dual-Light-Transilluminator
CCD-Camera	Ultralum, Carson Californien
Wasserbad	Haake 5P
	Haake C1

Tabelle 8.4.: Geräte für die Histologie

Glasmesserbrecher	LKB7800B KnifeMaker
Pyramitom	LKB11800 Pyramitom
Strecktisch	GFL, Burgwedel
Ultratom	LKB880A UltratomIII
Paraffin-Streckbad	GFL 1052, Burgwedel
Kritisch Punkt Trockner	Balzers, Lichtenstein
Goldsputterer	SC7620, Quorum Technologies

8.2. Chemikalien

Tabelle 8.5.: Allgemeine Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Fluka, Neu-Ulm
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Adenosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bacto-Trypton	Difco, Eggenstein
Blocking Reagenz	Roche, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat	Boehringer, Mannheim
Diaminobenzidin	Sigma, Deisendorf
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Diethylether	Roth, Karlsruhe
1,4-Di-thio-L-threitol (DTT)	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisendorf
Ethylen-diamino-tetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Plano, Wetzlar
Glycin	Roth, Karlsruhe

Tabelle 8.5.: Allgemeine Chemikalien

Heptan	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Levamisol	Sigma, Deisendorf
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Sigma, Deisendorf
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
4-Nitrotetrazoniumchlorid (NBT)	Roche, Mannheim
Octyl-phenol-polyethylen-glycolether (Triton X-100)	Roth, Karlsruhe
Poly-oxy-ethylen-sorbitan-mono-laurat (Tween 20)	Roth, Karlsruhe
bovines Serum-Albumin	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Select-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetra-ethyl-methylendiamin	Sigma, Deisendorf
Tris	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

Weitere Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Plano (Wetzlar) und Sigma (Deisendorf) bezogen.

8.3. Fliegenstämme

Tabelle 8.6.: Stämme mit mutanten Allelen

<i>Dp(?,2)bw^D, blow¹ bw¹/CyO</i>	Bloomington 4128
<i>blow²/CyO</i>	Steve Doberstein
<i>kette^{J4-48} st e/TM6</i>	Labor C. Klämbt (Münster)
<i>kette^{C3-20} st e AA142/TM6</i>	Labor C. Klämbt (Münster)
<i>kette^{G1-37} st e/TM6</i>	Labor C. Klämbt (Münster)
<i>kette^{J4-40} st e/TM6</i>	Labor C. Klämbt (Münster)
<i>kette^{P168} st e AA142/TM6</i>	Labor C. Klämbt (Münster)
<i>Abl¹ kar¹ red¹ e¹/TM6B</i>	Bloomington 3554
<i>Abl⁴ kar¹ red¹ e¹/TM6B</i>	Bloomington 3553
<i>P{PZ}Abl⁰⁴⁶⁷⁴ ry⁵⁰⁶/TM3, ry^{RK} Sb¹ Ser¹</i>	Bloomington 10184

Tabelle 8.6.: Stämme mit mutanten Allelen

$red^1 e^1 mbc^{C1}/TM3, P\{ftz - lacZ.ry^+\}TM3, SB^1$	Bloomington 1671
$w^{1118}; Src42A^{E1}/CyO$	Bloomington 6408
$w^{1118}; Src42A^{myri}/CyO$	Bloomington 6453
$y^1 w^{67c23}; P\{lacW\}Src42A^{k10108}/CyO, P\{Car20y\}EW1$	Bloomington 10969
$w^{1118}; PBac\{PB\}Src64B^{c04709}/TM6B, Tb^1$	Bloomington 11578
$y^1 w^{67c23}; P\{lacW\}Btk29A^{k00206}$	Bloomington 10469
$w^{1118}; P\{EP\}Btk29A^{EP2167}/CyO$	Bloomington 17325
$wg^{Sp-1} Bl^1 ena^{210}/CyO$	Bloomington 8586
$y^1; P\{SUPor - P\}Cbl^{KG03080} ry^{506}/TM3, Sb^1 Ser^1$	Bloomington 13944
$y^1 w^{67c23}; P\{EPgy2\}Pax^{EY00742}$	Bloomington 15313
$Df(2R)X1, Mef2^{X1}/CyO, Adh^{nB}$	Bloomington 1702
$cn^1 grh^{IM} bw^1 sp^1/CyO$	Bloomington 3270
prd^8/CyO	Bloomington 5806
$w^{ch2} N^{264-39}/FM4, B^+$	Bloomington 730
$P\{neoFRT\}43Dshark^1/CyO$	Bloomington 5865

Tabelle 8.7.: Balancer-, Marker-, Gal4-Treiber- und UAS-Stämme

If/CyO_{hglacZ}	(M. Affolter)
Dr/Sb_{TDLZ}	zur Verfügung gestellt von Anne Holz, Giessen
$Sco/CyO_{Act-GFP}$	Bloomington
$Dr/Sb, Ser_{Act-GFP}$	Bloomington
$twist - Gal4$	zur Verfügung gestellt von Anne Holz, Giessen
$SG24 - Gal4$	(Brand und Perrimon, 1993)
$rP298 - Gal4$	(Menon et al., 2001)
$UAS - Hem$ (lokalisiert auf Chr. II)	Sven Bogdan
$UAS - Hem$ (lokalisiert auf Chr. III)	Sven Bogdan
$UAS - Bcr : Abl$	Frances Fogerty (Fogerty et al., 1999)

8.4. Bakterien

Für die Transformation mit rekombinanten Plasmiden wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α ($supE44$, $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ \Delta M15$), $hsdR17$, $recA1$, $endA1$, $gyrA96$, $thi-1$, $relA1$) eingesetzt.

8.5. Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 8.8.: **Verwendete Oligonukleotide**

Primer für Reportergen-Konstrukte	
Tom	5'-GCACAAAAGGAAGCAAATACTTCGGC-3'
Bombadil	5'-GCCAAGAACCGCATACAAATCGG-3'
Peregrin	5'-GAGGTGATTCATGGTGGCGCAACAG-3'
Tuck	5'-CATGCTCGAGCAGAACCGATCGGATGCACTATC-3'
Primer für <i>in-situ</i> -Sonden	
Crkisfor	5'-GATCAAATCGTTTACCGCATTGGG-3'
Crkisrev	5'-CAATCATCGACAAATTCAACGTGCGTG-3'
pk17isfo	5'-CGACTCTGACCAACTCAATCTTC-3'
pk17isre	5'-CTGACAGGCAATAACGCCCAAG-3'
Skapfor	5'-AGAATGCGGTCTGTACCGG-3'
Skaprev	5'-GCCTGCTGTTGCAACTTTATG-3'
Primer für die positionsspezifische Punktmutagenese	
MutzuHis	5'-CGGATATCATC _c ACGAGGAGCCCTCG-3'
Mutrever	5'-CGAGGGCTCGTGGATGATATCCG-3'
Primer zur Klonierung der aktivierten Abelson-Kinase	
vSH3+ATG	5'-CATGTCTGAATACATCCGTGTTTGAATCCG-3'
ATyrKNot	5'-CATGCGGCCGCTTCGGTGATGGACG-3'
Sequenzier-Primer	
pChabΔSal3'	5'-TTG CTG GTG TCC AGA CCA ATG CCT-3'
pChabΔSal7	5'-GTT CAA TGA TGT CCA G-3'
T7	5'-AATACGACTCACTATAG-3'
Sp6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
M13forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13revers	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Die genannten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen.

8.6. Plasmide

Tabelle 8.9.: **Verwendete Plasmide**

Vektoren	
pChabHsp43	P-Element-Transformationsvektor zur Analyse eines Enhancers mittels <i>lacZ</i> , Thummel et al., 1988
pCRII-TOPO	Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
Blunt	

Tabelle 8.9.: Plasmide

pCRII-TOPO TA	Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pUASt	P-Element-Transformationsvektor zur Expression eines spezifischen ORFs,
Klon341	modifizierter pUASt-Vektor, S. Lier
EST-Klone	
LD21956	Pk17E, DGC cDNA
LD08427	Crk, DGC cDNA
LD03255	Abelson-Kinase, DGC cDNA
LD37010	Abi, DGC cDNA
MGC65975	Scap2-cDNA aus <i>Danio rerio</i> , RDGC
<i>sns</i> -Blueskript	6kB ORF von <i>sns</i> in pBlueskriptIIKS (S. Abmayr)
TOPO- <i>blow</i>	<i>blown-fuse</i> cDNA in pCRII-TOPO-TA, Falco Kurtz, Diplomarbeit 2003

8.7. Enzyme

Tabelle 8.10.: **Enzyme**

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonucleasen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
	Roche, Mannheim New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Peqlab, Erlangen und Quiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Vent DNA Polymerase	New England Biolabs

8.8. Antikörper und Seren

Tabelle 8.11.: **Verwendete Antikörper und Seren**

Primäre Antikörper:

α - β 3-Tubulin	Kaninchen	1:10.000	Buttgereit
α - β 3-Tubulin	Meerschweinchen	1:10.000	Buttgereit
α -Fasciclin III	Maus	1:500	Patel et al.
α - β -Galaktosidase (polyclonal)	Kaninchen	1:6.000	Biotrend, Köln
α - β -Galaktosidase (monoclonal)	Maus	1:6.000	Promega, Heidelberg
α -Blow	Kaninchen	1:1.000	Buttgereit
α -Kette	Kaninchen	1:50	Klämbt

Tabelle 8.11.: Antikörper und Seren

α -Alk	Meerschweinchen	1:5.000	Loren
α -Ubx			Rob White
α -Disabled	Maus	1:1.000	DSHB, Iowa
α -Paxillin	Ziege	1:5	Santa Cruz
α -DIG (monoclonal)	Schaf	1:1000	Roche, Basel
α -PTyr100	Maus	1:2000	Promega, Heidelberg

Sekundäre Antikörper:

α -Kaninchen-IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingham
α -Kaninchen-IgG, Cy ² -gekoppelt	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen-IgG, Cy ³ -gekoppelt	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen-IgG, Cy ⁵ -gekoppelt	Dianova, Hamburg
α -Maus-IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingham
α -Maus-IgG, Cy ² -gekoppelt	Dianova, Hamburg
α -Maus-IgG, Cy ³ -gekoppelt	Dianova, Hamburg
α -Meerschweinchen-IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingham
α -Meerschweinchen-IgG, Cy ² -gekoppelt	Dianova, Hamburg
α -Meerschweinchen-IgG, Cy ³ -gekoppelt	Dianova, Hamburg
α -Ziegen-IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingham
α -Schaf-IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingham
α -DIG-AP-F(AB'2)-Fragment	Boehringer, Mannheim

Seren:

Pferdeserum	Vector Laboratories, Burlingham
Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlingham
Eselserum	Vector Laboratories, Burlingham
Kaninchenserum	(Buttgereit)

8.9. Internet-Server und Analyse-Programme

Zur Datenbankrecherche und *in-silico*-Analyse von DNA- bzw. Aminosäure-Sequenzen wurde auf folgende Datenbank-Server und Analyse-Programme zurückgegriffen:

Flybase <http://flybase.bio.indiana.edu/> (Grumbling et al. 2006)

FlyMine <http://www.flymine.com>

BioGrid <http://www.biogrid.com> (Stark et al., 2006)

IM-Drosophila-Interactions-Database <http://proteome.wayne.edu> (Pacifico et al., 2006)

NetPhos2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> (Blom et al., 1999)

Scansite2.0 <http://scansite.mit.edu/> (Obenauer et al., 2003)

ELM-Server <http://elm.eu.org/> (Puntervoll et al., 2003)

ExpasyTools www.expasy.org (Gasteiger et al., 2003)

DNASTar (Sequenzanalyse-Programm)

National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Benson et al., 2004)

EMBL Nukleotide Sequence Database <http://www.ebi.ac.uk/embl> (Baker et al., 2000)

Die Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop 6.0 bzw. 7.0 durchgeführt.

9. Umgang mit *Drosophila melanogaster*

9.1. Zucht und Haltung von *Drosophila melanogaster*

(Harbecke, 1985)

9.1.1. Zucht- und Nährmedien

Tabelle 9.1.: **Zuchtmedium für die Haltung von *Drosophila melanogaster***

Agar	90 g
Maismehl	1 kg
Trockenhefe	180 g
Malzextrakt	1 kg
Zuckerrübensirup	230 g
20% Nipagin in 70% Ethanol	120 ml
20% Propionsäure	360 ml
Wasser	ad 12 l

Tabelle 9.2.: **Fruchtsaftagar zur Gewinnung von *Drosophila*-Embryonen**

Fruchtsaft	500 ml
Select-Agar	54 g
Zucker	24 g
Nipagin	4 g
Wasser	1,5 l

9.1.2. Stammhaltung

Die Fliegen wurden in zylindrischen Polystyrol-Röhrchen verschiedener Größe, die mit einem Ceaprenstopfen verschlossen wurden, gehalten. Um einen Befall mit Raubmilben zu verhindern, wurden gegebenenfalls an Stell der Ceaprenstopfen spezielle Stopfen mit einer Unterseite aus Polyurethan (**Greiner**) verwendet, die ein Eindringen der Milben in die Flaschen verhindert. Als Futter wurde das Nährmedium ungefähr 2 cm hoch in die Flaschen gefüllt und zusätzlich mit Trockenhefe als Stimulus für die Eiablage bestreut.

Die Stammhaltung erfolgte in Klimakammern bei 18°C und 70% relativer Luftfeuchtigkeit. In Einzelfällen und zur Auswertung von speziellen Kreuzungen wurden die Fliegen bei 24°C und 70% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle 1 bis 2 Wochen wurden die Fliegen-Stämme auf frische Flaschen umgesetzt. Sollte ein Fliegen-Stamm für Experimente vermehrt werden, wurde diese Frequenz erhöht.

9.1.3. Kreuzungsexperimente

Um bestimmte transgene oder mutante *Drosophila*-Linien genauer untersuchen zu können, waren im Verlauf der Arbeit verschiedene Kreuzungsschritte, wie z.B. Lokalisation von P-Element, Rekombinationen oder Umbalacierungen notwendig. Dazu wurden die Fliegen analog zur Stammhaltung auf zylindrischen Plastikflaschen mit 3,5 cm Durchmesser bei 24°C in der Klimakammer gehalten.

9.1.4. Sammlung von *Drosophila*-Embryonen

Zur Gewinnung von *Drosophila*-Embryonen wurde die gewünschte Parentalgeneration an Stelle von Futterflaschen auf Flaschen, deren Boden ca. 3 cm hoch mit Fruchtsaftagar bedeckt war, gehalten. Auch hier wurde als Eiablage-Stimulans Trockenhefe auf den Fruchtsaftagar gestreut. Die Flaschen wurden je nach gewünschtem Entwicklungsstadium der abgelegten Eier mindestens einmal am Tag gewechselt und bei entweder 18°C oder 24°C inkubiert.

Für die Sammlung größerer Embryonenmengen wurden Ablageglocken verwendet, die mit einer mit Fruchtsaft gefüllten Petrischale am Boden verschlossen wurden. Hier wurde an Stelle der Trockenhefe eine Spatelspitze von in Wasser gelöster Trockenhefe verwendet. Diese Ablageglocken wurden auch verwendet, wenn das gewünschte Zeitfenster bezüglich des zu erzielenden Entwicklungsstadiums sehr eng war.

Für die Sammlung sehr großer Embryonenmengen wurde ein Käfig mit *Drosophila* angesetzt, der mit Styroporablageschalen mit Fruchtsaftagarboden - ebenfalls mit in Wasser gelöster Trockenhefe bestrichen- bestückt wurde.

9.2. Etablierung transgener *Drosophila*-Stämme

(Rubin und Spradling, 1982)

Zur Etablierung transgener *Drosophila*-Stämme wurde zunächst durch P-Element-Transformation das gewünschte P-Element-Plasmid in die Keimbahn von *white*⁻-Fliegen eingebracht. Mit den erhaltenen transgenen Fliegen wurden in der Folge stabil-transgene Linien etabliert. Dabei war die Identifikation der individuellen transgenen Tiere anhand der Augenfarbe möglich, wobei das auf allen verwendeten P-Element-Plasmiden vorhandene *white*⁺-Gen ausgenutzt wurde. Mit dessen Hilfe wurde in den transgenen Tieren die *white*⁻-Mutation komplementiert, so dass transgene Tiere eine rot-orange Augenfarbe zeigen.

9.2.1. P-Element-Transformation

Für die Durchführung der P-Element-Transformation wurde ein Injektionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl Injektionspuffer hergestellt, der 5 µg des gewünschten ins Genom zu integrierenden DNA und 2,5 µg des Helferplasmids pπ enthielt. Dieser Ansatz wurde wie folgt in *white*⁻-Embryonen der Stadien 0 bis 4 eingebracht:

Die Embryonen wurden in TNX gewaschen und mit Chlorbleiche entchorionisiert. Aus einer Petrischale mit 8 cm Durchmesser, die ca. 0,5 cm hoch mit Fruchtsaftagar gefüllt war, wurde ein ca. 2x6 cm großes Bassin ausgeschnitten. Auf dem ausgehobenen Stück Agar wurden die Embryonen in einer Reihe ausgerichtet und

von dort mit Hilfe eines mit Heptankleber beschichteten Deckgläschens abgenommen. Im Anschluss wurden die Embryonen 10 Minuten im Exsikator getrocknet, um zu verhindern, dass sie bei der Injektion durch zu hohen Innendruck platzen. Das Deckgläschen wurde danach in den Kreutztisch der Injektionsapparatur, bestehend aus Inversmikroskop und Mikromanipulator, eingespannt. Eine mit Hilfe des Vertical Pipette Pullers ausgezogene Kapillarnadel wurde mit dem Injektionsansatz beladen und in die Mikroinjektionsapparatur gebracht. Mit dieser Anordnung wurde die gewünschte DNA in alle Embryonen, die das Stadium 4 noch nicht überschritten hatte, injiziert. Ältere Embryonen, bei denen bereits Polzellen sichtbar waren - eine stabile Integration des gewünschten P-Elements also nicht mehr möglich war - wurden mit der Injektionsnadel seitlich aufgerissen, so dass sie sich nicht mehr entwickeln konnten.

Nach erfolgter Injektion wurden die Embryonen mit Voltalef-Öl überschichtet, um ein Austrocknen während der nun folgenden Entwicklungszeit zu verhindern. Das Deckgläschen mit den Embryonen wurde in die vorbereitete Petrischale gesetzt und das Bassin in der Petrischale mit Wasser befüllt, um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Ungefähr 24 Stunden später begannen die entwickelten Larven zu schlüpfen und wurden anschließend auf Flaschen mit Zuchtmedium überführt, wo sie sich bis zum Adultus entwickeln konnten.

Tabelle 9.3.: **Materialien für die Etablierung transgener Fliegen**

Injektionspuffer	0,1 mM $Na_2HPO_4/Na_2H_2PO_4$, pH 7,4 5 mM KCl
p π 25.7wc	Helferplasmid für die P-Element-Transformation
Heptan-Kleber	Tesa-Packband™ gelöst in Heptan
Voltalef-Öl	Lehmann, Voss & Co., Hamburg

9.2.2. Etablierung stabil-transgener *Drosophila*-Linien

Zur Etablierung stabil-transgener *Drosophila*-Linien wurden in der G 0-Generation die nach der P-Element-Transformation erhaltenen uniform weißäugigen adulten Tiere in Eizelpaarzuchten mit *white*⁻-Tieren gekreuzt. Sofern die P-Element-Transformation erfolgreich war, konnten daraufhin in der F 1-Generation jeweils einzelne Tiere mit rot-orangen Augen erhalten werden. Dabei konnte es sich entweder um Zwillingstiere, die die identische P-Element-Integration tragen, oder um Tiere mit unabhängigen Integrationen handeln. Zur weiteren Segregation möglicher Mehrfachintegrationen wurden die erhaltenen transgenen Tiere wiederum in Eizelpaarzuchten mit *white*⁻-Tieren gekreuzt. Dies wurde mehrfach wiederholt. Im Anschluss wurden möglichst hell-rotäugige Tiere untereinander verkreuzt, um in der nächsten Generation homozygot transgene Tiere zu erhalten. Diese zeichnen sich wiederum durch eine wesentlich intensivere Augenfarbe aus, wodurch sie in den meisten Fällen von den heterozygoten Tieren unterschieden werden und für die weitere Zucht und Etablierung der Stammlinien ausgewählt werden können. Gegebenenfalls wurde mit Hilfe von geeigneten Markern schließlich die chromosomale Lokalisation des integrierten P-Elementes bestimmt.

10. Histologische Methoden

10.1. Vorbereitung von *Drosophila*-Embryonen zur histologischen Analyse

Tabelle 10.1.: Fixantien

4% F-PBS	4% Paraformaldehyd in PBS
25% Glutaraldehyd	wässrige Lösung ultrarein für die Elektronenmikroskopie, Plano (Wetzlar)
2% Osmiumtetroxid	wässrige Lösung für die Elektronenmikroskopie, Plano (Wetzlar)

Tabelle 10.2.: Puffer und Lösungen für die Histologie

TNX	7 g $NaCl$ 0,1 ml 10% Triton ad 1 l H_2O
PBS (10x Stock)	130 mM $NaCl$ 7 mM Na_2HPO_4 3 mM NaH_2PO_4
Chlorbleichlösung	Klorix Haushaltsreiniger, 1:1 wässrig verdünnt
Sörensenpuffer	0,2 M KH_2PO_4 0,2 M Na_2HPO_4

10.1.1. Sammeln der Embryonen

Zu Beginn aller im Folgenden aufgeführten Fixierungsmethoden und Analysen wurden die Embryonen mit TNX-Lösung von der Ablageschale bzw. aus der Ablageflasche gewaschen und in einem Netzchen (siehe 8.1 S. 45) gesammelt.

10.1.2. Entfernung des Chorions

Vor der weiteren Bearbeitung wurde das Chorion von den Embryonen entfernt, um ein gleichmäßiges Eindringen von Reagenzien zu gewährleisten. Dazu wurden

die gesammelten Embryonen ca. 2 Minuten in einer wässrigen Chlorbleich-Lösung gewaschen und anschließend wieder in TNX-Lösung überführt.

10.1.3. Entfernung der Vitellinmembran

Für die meisten Analysemethoden wurde ausserdem die Vitellinmembran der Embryonen entfernt. Dies geschah entweder durch Behandlung mit Heptan/Methanol nach der Fixierung (Formaldehyd- und Heißfixierungen) oder per Hand-Präparation vor bzw. während der Fixierung wenn ein Kontakt mit Methanol zum besseren Erhalt der Zellmembranen vermieden werden sollte (Elektronenmikroskopische Methoden, F-Aktin-Nachweis).

Bei der Entfernung mit Heptan/Methanol wurden die Embryonen 2 Minuten in einem 1:1-Gemisch aus Heptan und Methanol kräftig geschüttelt. Dadurch wurde ein Aufplatzen der Vitellinmembran provoziert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß mindestens 1 Minute ruhen gelassen, damit die aus der Vitellinmembran befreiten Embryonen zu Boden sinken konnten. Der Überstand wurde entfernt und die Embryonen in Methanol aufgenommen.

Zur Entfernung der Vitellinmembran mit der Hand wurden die ca. 20 Minuten in F-PBS oder Glutaraldehyd vorfixierten Embryonen mit Hilfe eines Pinsels in ein mit Heptan-Kleber beschichtetes Blockschälchen überführt und mit physiologischer Pufferlösung die der jeweils später zu verwendenden Pufferlösung entsprach (PBS für F-Aktin-Nachweise, Sörensenpuffer für TEM) dünn überschichtet. Mit einer dünn ausgezogenen Glaskapillare wurden sie dann im Bereich der Mikropyle aufgeritzt wodurch analog zur Heptan/Methanol-Behandlung ein Platzen der Vitellinmembran provoziert wurde. Die entvitellinisierten Embryonen wurden anschließend mit einer Pipette abgesammelt und in ein frisches Reaktionsgefäß mit Pufferlösung überführt.

10.1.4. Formaldehydfixierung

Nach der Entfernung des Chorions wurden die Embryonen erneut in TNX gewaschen und mit Hilfe eines in Heptan getränkten Pinsels in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 500 μ l Heptan vorgelegt waren. Dazu wurden nun 500 μ l 4% Paraformaldehyd in PBS gegeben. Der Ansatz wurde 10 bis 20 Minuten unter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Phasen abgenommen und die Embryonen zweimal in je 1 ml Heptan gewaschen, bevor die Vitellinmembran entfernt wurde.

10.1.5. Glutaraldehyd-Fixierung

Die gesammelten Embryonen wurden nach dem Entfernen des Chorions mit den Netzchen, in denen sie sich befanden, in ein Blockschälchen überführt, das ein Gemisch aus 975 μ l Heptan und 25 μ l 25% Glutaraldehyd enthielt. Dort wurden sie 10 bis 20 Minuten unter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurde das Fixiergemisch abgenommen und zweimal mit Heptan gewaschen. Danach wurden die Embryonen im Netzchen vorsichtig und kurz getrocknet bis alle Heptanreste entfernt waren. Die so fixierten Embryonen konnten nun im gewünschten Puffer aufgenommen und weiter behandelt werden.

10.1.6. Heißfixierung

Die entchorionisierten Embryonen wurden mit dem Netzchen, in dem sie sich befanden zunächst 10 Sekunden in kochendes und anschließend 10 Sekunden in eiskaltes PBS getaucht. Danach wurde dem jeweiligen Protokoll entsprechend die Vitellinmembran entweder per Hand oder durch Behandlung mit Heptan/Methanol entfernt.

10.1.7. Fixierung für die Raster-Elektronenmikroskopie

Für die Raster-Elektronenmikroskopie wurden Mitteldärme von Embryonen, ersten, zweiten und dritten Larven sowie adulten Fliegen unter PBS freipräpariert und dann mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in einer 4% Verdünnung von Glutaraldehyd in PBS fixiert. Danach wurden die Därme zweimal in Wasser gewaschen und erneut eine Stunde in 1% Osmiumtetroxid in PBS fixiert.

10.1.8. Fixierung für die Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die wie oben beschrieben entchorionisierten Embryonen wurden 20 bis 60 Minuten in einer 1:1 Mischung aus 18% Glutaraldehyd in Sörensenpuffer und Heptan vorfixiert. Anschließend wurde die Vitellinmembran mit der Hand abpräpariert und die so gewonnenen Embryonen zwei Stunden in einem 1:1 Gemisch aus 4% Glutaraldehyd in Sörensenpuffer und 2% wässriger Osmiumtetroxid-Lösung fixiert. Danach erfolgten vier jeweils 15-minütige Waschschrte in Sörensenpuffer unter Bewegung bei Raumtemperatur, bevor schließlich zur Kontrastverstärkung erneut 1 Stunde in 1% wässriger Osmiumtetroxid-Lösung in Sörensenpuffer fixiert wurde.

10.2. Spezifischer Proteinnachweis an *whole-mount* Präparaten

Zur Analyse von Protein-Verteilungen bzw. zur Phänotyp-Analyse von mutanten Embryonen wurden verschiedene immunhistologische Nachweismethoden verwendet, die im Folgenden erläutert werden. Die dabei verwendeten Antikörper und Seren sind in Tabelle 8.11 zusammengestellt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur und unter Bewegung durchgeführt.

Tabelle 10.3.: **Puffer und Reagenzien für den histologischen Antikörpernachweis**

DAB	Sigma, Deisenhof
PBT	1x PBS (s.o.) mit 0,1% Tween-20
Vectastain-ABC-Kit	siehe <i>in-situ</i> -Hybridisierung
TSA-fluo-Kit	siehe <i>in-situ</i> -Hybridisierung

10.2.1. Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörperrnachweis

(nach Ngyuen, H.T. und Xu,X., 1998)

Für den fluoreszenz-immunhistologischen Nachweis von Proteinen wurden sowohl formaldehyd- als auch heißfixierte Embryonen verschiedener Stadien eingesetzt. Diese wurden zunächst durch mehrmaliges Waschen (3-5x) in PBT rehydriert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Erst-Antikörper in geeigneter Verdünnung über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurde die Antikörperverdünnung abgenommen und ggf. für weitere Verwendungen bei 4°C aufbewahrt. Überschüssiger Antikörper wurde viermal 15 Minuten mit PBT ausgewaschen. Danach wurden die Embryonen für eine Stunde in PBT inkubiert. Dabei wurde dem PBT 1/20 Serum, das dem Zweit-Antikörper-liefernden Organismus entsprach zugesetzt. Dies sollte eine spätere unspezifische Bindung des Zweit-Antikörpers soweit wie möglich verhindern. Schließlich wurde das Serum wieder abgenommen und die Embryonen wurden für 1,5 bis 2 Stunden mit einer geeigneten Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweit-Antikörpers inkubiert. Dabei mussten von jetzt an alle Schritte im Dunkeln erfolgen, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Um überschüssigen Zweit-Antikörper zu entfernen, wurden die Embryonen vor der Einbettung mindestens viermal für 15 Minuten gewaschen.

10.2.2. Antikörperdetektion nach der Avidin-Biotinylated-Enzyme-Complex Methode

(Lawrence und Johnston, 1989)

Die Embryonen wurden zunächst analog zum Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörperrnachweis behandelt. Anstelle eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweit-Antikörpers wurde jedoch ein zuvor ca. 1 Stunde lang an Wildtyp-Embryonen in einer Verdünnung von 1:20 in PBT präadsorbierter Biotin-gekoppelter Zweitantikörper verwendet. Nach 1,5 stündiger Inkubation mit einer 1:5000 Verdünnung des Zweit-Antikörpers in PBT wurden die Embryonen dreimal 10 Minute in PBT gewaschen. Gleichzeitig wurden in 1 ml PBT jeweils 10 µl Lösung A und Lösung B des Verstärker-Kits miteinander 30 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert. Im Anschluss wurden die Embryonen für 1 Stunde mit 500 µl der präinkubierten Verstärkerlösung behandelt. Um unspezifische Hintergrundfärbung durch das Verstärker-Kit zu vermeiden, wurden die Embryonen vor dem immunhistochemischen Nachweis der Meerrettichperoxidase mindestens viermal für 15 Minuten in PBT gewaschen. Nach dem Auswaschen des Verstärker-Überschusses wurden die Embryonen schließlich in 500 µl PBT in Blockschälchen überführt. Dort wurde dann die Färbung wie folgt durchgeführt: Zunächst wurden 10 µl DAB und ggf. zur weiteren Verstärkung 5 µl $NiCl_2$ als Schwermetallionenquelle zugefügt. Nach gründlicher Vermischung mit den Embryonen wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl H_2O_2 gestartet. Durch die Spaltung des Diaminobenzidins entsteht in der Folge eine dunkelbraun bis schwarze Färbung an den Stellen im Embryo an denen sich der Antikörper-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex abgelagert hat. Nach dem Erreichen der gewünschten Färbintensität wurde die Nachweisreaktion durch das Auswaschen überschüssiger Reagenzien mit PBT gestoppt. Schließlich wurden die Embryonen über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und entweder

in 70% Alkohol gelagert oder direkt in Epon eingebettet.

10.2.2.1. Verstärkung von Färbungen mit dem TSA-Kit

Eine zusätzliche Verstärkung fluoreszierender Antikörperdetektionen konnte mit Hilfe des TSA-fluo-Kits erreicht werden. Dazu wurde zunächst wie bei einer Antikörperdetektion nach der Avidin-Biotinylared-Enzyme-Complex-Methode verfahren. Nach Inkubation mit dem Vectastain-ABC-Kit wurde jedoch überschüssige Verstärkerlösung dreimal 30 Minuten ausgewaschen. Schließlich wurden die Embryonen 30 Minuten in einer 1:50-Verdünnung des TSA-fluo-Kits im Dunkeln inkubiert. Überschüssiges TSA wurde durch viermaliges jeweils 15 Minuten dauerndes Waschen in PBT ausgespült. Danach wurde das Ergebnis der Färbung an einem kleinen Aliquot der Embryonen kontrolliert. Bei einer guten Färbung mit geringem Hintergrund wurden die Embryonen 10 Minuten auf 70°C erhitzt, in PBT gewaschen und schließlich in Fluoromount eingebettet.

10.3. mRNA-Nachweis an *whole-mount*-Präparaten

(Tautz und Pfeifle, 1989)

Zum Nachweis spezifischer mRNA in Embryonen wurden sowohl DNA als auch RNA-Sonden verwendet, die jeweils mit DIG-Oxygenin markiert wurden. Vor dem Einsatz in der in-situ-Hybridisierung wurde die entsprechende Sonde mittels eines Spot-Testes überprüft, um die optimale einzusetzende Konzentration zu bestimmen. Die zu analysierenden Embryonen wurden wie unter 10.1 beschrieben vorbereitet. Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Schritte bei Raumtemperatur unter Bewegung durchgeführt.

Tabelle 10.4.: Materialien für die *in-situ*-Hybridisierung

DIG-RNA-Labeling-Kit	Boehringer, Mannheim	
dNTP-Labeling-Mix	Roche, Basel	
Hybond-N-Membran	Amersham, Braunschweig	
SSC(20x Stock)	3 M	<i>NaCl</i>
	0,3 M	Natrium-Citrat
Hybridisierungspuffer	125 ml	Formamid
	62,6 ml	20x SSC
	0,25 ml	Heparin (50 mg/ml)
	0,25 ml	Tween-20
	ad 250 ml mit a.dest	
DIG-1 Lösung (10x Stock, pH 7,5)	0,1 M	Tris/HCl
	0,15 M	<i>NaCl</i>
DIG-2 Lösung	DIG-1	

Tabelle 10.4.: Material *in-situ*-Hybridisierung
0,5 % (v/v) Blockingreagenz (Boehringer)

DIG-3 Lösung (pH 9,5)	0,1 M	Tris/HCl
	0,1 M	<i>NaCl</i>
	0,05 M	<i>MgCl₂</i>
Hybridisierungs-Lösung für Spot-Test's	5x SSC	
	0,1 %	N-Laurylsarcosylat
	0,02 %	SDS
	1 %	Blockingreagenz (Boehringer)
NBT	Boehringer, Mannheim	
X-Phosphat	auch Boehringer?	
Vectastain-ABC-Kit	Elite Kit PK-6100 Standard, Camon, Wiesbaden	
TSA(Cyanin3)System-NEL 704A	NEN, Boston	

10.3.1. Herstellung von DIG-Oxygenin-markierten RNA-Sonden durch in-vitro-Transkription

Für die in-vitro-Transkription wurde zunächst ein Plasmid, das die gewünschte als Sonde zu verwendende Sequenz enthielt, mit Hilfe eines geeigneten Restriktionsenzymes linearisiert (vgl. 11.8). Im Anschluß wurde die DNA durch eine Ethanol-fällung (vgl. 11.2) von den Restriktionsenzymen befreit und aufgereinigt. Die Transkription fand in einem Gesamtvolumen von 20 μ l, bestehend aus 2 μ l 10x Random-Labeling-Puffer, 2 μ l DIG-RNA-Labeling-Mix, 2 μ l RNA-Polymerase T7 (= 2 u) zusammen mit 200 ng linearisierter DNA in bidestilliertem sterilem Wasser, statt. Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

10.3.2. Herstellung von DIG-Oxygenin-markierten DNA-Sonden per PCR

Sollte eine DNA-Sonde für die in-situ-Hybridisierung verwendet werden, so wurde sie mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (vgl. 11.3) unter Verwendung des dNTP-Labeling-Mixes der Firma Roche hergestellt.

10.3.3. Spot-Test für DIG-Oxygenin-markierte Sonden

Um die markierte Sonde zu testen, wurde jeweils 1 μ l einer 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10.000 Verdünnung als Punkt auf ein Stückchen Hybond-N-Membran aufgetropft und dort mit Hilfe des UV-Crosslinkers durch 1,5 minütiges Bestrahlen mit UV-Licht fixiert. Die so behandelte Membran wurde für eine Minute in DIG-1 Lösung äquilibriert und anschließend für 30 Minuten in DIG-2 Lösung geblockt. Danach wurde sie 1,5 Stunden lang mit dem 1:5000 in DIG-3 Lösung verdünnten anti-DIG-AP-FAB-Fragment-Antikörper inkubiert. Schließlich wurde die Membran in eine neue Petrischale überführt, zweimal 15 Minuten in DIG-1 Lösung gewaschen und für zwei Minuten in DIG-3 Lösung äquilibriert. Die Farbreaktion erfolgte für 10 Minuten

im Dunkeln in 1 ml DIG-3 Lösung, dem 4,5 μ l NBT und 3,5 μ l X-Phosphat zugefügt wurden. Die Färbung wurde durch Abspülen mit Wasser beendet.

10.3.4. *in-situ*-Hybridisierung

Die vorbehandelten Embryonen wurden zunächst über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und schließlich dreimal 5 Minuten in PBT gewaschen. Als nächstes wurde eine Lösung aus 2 mg Glycin pro ml PBT vorbereitet und auf Eis gelagert. Zu den Embryonen wurde 50 μ g/ml Proteinase K gegeben und exakt 90 Sekunden inkubiert, dabei wurden sie auf der Laborbank stehen gelassen. Die Proteinase K-Behandlung wurde durch zweimaliges Waschen mit der vorbereiteten Glycin-Lösung gestoppt. Anschließend wurden die Embryonen 20 Minuten in 4% F-PBS nachfixiert und zweimal für 10 Minuten in PBT gewaschen.

Für die eigentliche Hybridisierung wurden die Embryonen zunächst in einem 1:1 Gemisch aus Hybridisierungslösung und PBT und danach in reiner Hybridisierungslösung jeweils 10 Minuten inkubiert. Schließlich erfolgte die Prähybridisierung in 100 μ l Hybridisierungslösung bei 45°C (DNA-Sonden) bzw. 55°C (RNA-Sonden) für mindestens 1-6 Stunden im Heizblock. Kurz vor Ende der Prähybridisierung wurde die DIG-markierte Sonde 5 Minuten in der gewünschten Konzentration in 5 μ l Hybridisierungslösung im Wasserbad aufgekocht, anschließend sofort kurzzeitig auf Eis gelagert und dann zu den prähybridisierten Embryonen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei der entsprechenden Temperatur im Heizblock.

Am nächsten Morgen wurden die Embryonen zunächst dreimal für 20 Minuten bei Hybridisierungstemperatur in jeweils 1 ml Hybridisierungslösung gewaschen. Gleichzeitig wurden beliebige Wildtyp-Embryonen rehydriert und an ihnen der anti-AP-FAB-Fragment-Antikörper zur Verringerung des unspezifischen Hintergrundes in einer Verdünnung von 1:20 präadsorbiert.

Die zu färbenden Embryonen wurden durch jeweils 20 minütiges Waschen bei Hybridisierungstemperatur in 60% bzw. 20% Hybridisierungslösung (v/v) in PBT rücküberführt und zweimal 20 Minuten bei Raumtemperatur in PBT gewaschen, bevor sie für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer 1:2000 Verdünnung des präadsorbierten Antikörpers inkubiert wurden. Überschüssiger Antikörper wurde viermal 20 Minuten mit PBT ausgewaschen, bevor die Embryonen dreimal 10 Minuten in Färbepuffer inkubiert wurden. Schließlich erfolgte die Färbung in der Dunkelheit in 1 ml Färbepuffer, dem 3,5 μ l X-Phosphat und 3,5 μ l NBT zugesetzt wurden. Sobald der gewünschte Färbegrad erreicht war wurde die Reaktion durch Waschen in PBT gestoppt und die Embryonen entweder in 50% Glycerin im Kühlschrank aufbewahrt oder direkt zur Auswertung eingebettet.

10.3.5. Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung (FISH)

(nach Nguyen, H.)

Für die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte *in-situ*-Hybridisierung wurde analog zur oben beschriebenen *in-situ*-Hybridisierung mit folgenden Abwandlungen vorgegangen: Es wurde keine Proteinase-K-Behandlung durchgeführt und anstelle des anti-AP-FAB-Fragment-Antikörpers ein anti-DIG-Schaf-Antikörper verwendet. Zur Detektion des Schaf-Antikörpers wurde in der Folge mit einem biotinylierten anti-Schaf-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in PBT bei 4°C über Nacht unter Be-

wegung inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der überschüssige Zweit-Antikörper durch viermaliges 30 Minuten dauerndes Waschen mit PBT entfernt. Parallel wurde wie unter 10.2 beschrieben das Vectastain-ABC-Verstärker-Kit angesetzt. Mit diesem wurden die Embryonen eine Stunde lang inkubiert. Danach wurden sie erneut dreimal für 30 Minuten mit PBT gewaschen. Die Fluoreszenz-Färbung erfolgte mit Hilfe des TSA-fluo-Kits in einer Verdünnung von 1:50 30 Minuten im Dunkeln. Überschüssiges TSA-fluo wurde durch viermaliges 15 Minuten dauerndes Waschen in PBT ausgespült. Danach wurde das Ergebnis der Färbung an einem kleinen Aliquot der Embryonen kontrolliert. Bei einer guten Färbung mit geringem Hintergrund wurden die Embryonen 10 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend erneut in PBT gewaschen. War der Hintergrund im Verhältnis zur gewünschten spezifischen Färbung dagegen noch sehr stark, so wurde vor dem Erhitzen erneut mehrfach mit PBT gewaschen. Zum Schluss wurde entweder eine zusätzliche Antikörper-Detektion, wie unter 10.2 beschrieben, durchgeführt oder die Embryonen wurden direkt in Fluoromount eingebettet.

10.4. Nachweis von β -Galactosidase-Aktivität mittels X-Gal-Blaufärbung an Embryonen

(Sambrook et al., 2001)

Tabelle 10.5.: Material für den β -Galaktosidase-Nachweis

4%-X-Gal	100 mg X-Gal (5 - Br - 4 - Cl - 3 - indoxyl - β - D - galactosid)
	1,25 ml Dimethylformamid
Färbelösung	100 ml 10mM Phosphatpuffer
	300 μ l Triton X-100
	0,876 g NaCl
	0,02 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
	0,131 g $K_4[Fe(II)(CN)_6]$
	0,102 g $K_3[Fe(III)(CN)_6]$

Zum Nachweis von aktiver β -Galaktosidase wurden die Embryonen mit Glutaraldehyd fixiert (vgl. 10.1). Der Aktivitätsnachweis wurde dann mit Hilfe von X-Gal durchgeführt. Dazu wurden die fixierten Embryonen mindestens 1 Stunde bei 37°C in 1 ml Färbelösung der 20 μ l X-Gal zugesetzt wurden inkubiert und regelmäßig auf blauen Farbumschlag in dem entsprechenden Gewebe kontrolliert. Die Färbung wurde durch mehrmaliges Waschen in PBT bzw. Sörensenpuffer beendet.

10.5. Detektion von F-Aktin mittels Phalloidin

(Sambrook et al., 2001)

Tabelle 10.6.: Materialien für den F-Aktin-Nachweis

TRITC-gekoppeltes Phalloidin	Fluka
------------------------------	-------

Zur Detektion von filamentärem Aktin wurden die Embryonen zunächst mit 4%-FBS fixiert. Im Anschluss wurde die Vitellinmembran per Hand entfernt, um störende Effekte, die durch Methanol entstehen können, zu vermeiden. Danach wurden die Embryonen 20 Minuten im Dunkeln mit in PBT verdünntem 0,5%-Phalloidin inkubiert. Die Färbung wurde durch mehrmaliges Waschen in PBT beendet. Gegebenenfalls wurde im Anschluß eine Antikörperfärbung durchgeführt.

10.6. Einbettung von *whole-mount*-Präparaten

Tabelle 10.7.: Einbettungsmedien

Fluoromount G	Southern Biotech
Epon	Zweikomponenten-Kunstharz aus: <i>Lösung A</i> 76,99 g Epoxy-Einbettungs-Medium (Fluka) 100 g DDSA (Fluka) <i>Lösung B</i> 174 g Epoxy-Einbettungs-Medium (Fluka) 109,47 g MNA (Fluka)
DMP	Epon-Beschleuniger, Fluka

Fluoreszierende *whole-mount*-Präparate wurden auf einen Tropfen Fluoromount G (ca. 100 μ l), der auf einem Objektträger vorgelegt wurde, aufgetropft, mit einem Deckgläschen bedeckt und bei 4°C gelagert.

Immunhistochemisch gefärbte Präparate wurden in Epon-Kunstharz eingebettet. Dazu wurden die Lösungen A und B des Zweikomponenten-Harzes im Verhältnis 1:1 gemischt und 1,5% (v/w) DPM zugegeben. Die entwässerten Embryonen wurden auf einen Tropfen Epon-Mischung, der auf einem Objektträger vorgelegt wurde,

aufgetropft. Der Alkohol, in dem sich die Embryonen befanden, wurde bei Raumtemperatur verflüchtigt und die Embryonen schließlich mit einem Deckgläschen bedeckt. Anschließend wurde das Präparat zur Polymerisation des Kunstharzes mindestens 48 Stunden bei 60°C im Wärmeschrank gelagert.

10.7. Raster-Elektronenmikroskopie

(Sambrook et al., 2001)

Tabelle 10.8.: Material für die Raster-Elektronen-Mikroskopie

EtOH, Aceton, Cu_2SO_4	Sigma
Klebpunkte	Plano, Wetzlar
Probenteller	Plano, Wetzlar

Die wie unter 10.1 beschrieben fixierten Präparate wurden über folgende aufsteigende Alkoholreihe entwässert: 2x 30 Minuten 30% EtOH, 2x 30 Minuten 50% EtOH, 2x 30 Minuten 70% EtOH, 2x 30 Minuten 80% EtOH, 2x 30 Minuten 90% EtOH, 2x 1h abs. EtOH, über Nacht Aceton getrocknet über Cu_2SO_4 , 1x 1 bis 3 Stunden Aceton getrocknet über Cu_2SO_4 . An die vollständigen Entwässerung anschließend wurde das Aceton mit Hilfe von Critical-point-Trocknung gegen CO_2 ausgetauscht. Die so vorbereiteten Präparate wurden mit Klebpunkten auf Probentellern befestigt und 2 Minuten mit Gold besputtert bevor sie am Raster-Elektronen-Mikroskop ausgewertet wurden.

10.8. Transmissions-Elektronenmikroskopie

(Franke et al., 1969, Lin et al., 1994, Stollewerk et al., 1996)

Tabelle 10.9.: Materialien für die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Uranylacetat	Plano, Wetzlar
Methylenblau	1% Lsg. in 50% Ethanol
Blei(II)-citrat tribasisches Trihydrat	Fluka, Neu-Ulm
Dioxan	Roth, Karlsruhe
Epon	8:2 Gemisch aus Lösung A und B (s.o.)
Spurr'sches Medium	26 g NSA (Plano, Wetzlar)

Tabelle 10.9.: Material TEM

	10 g	ERL (Plano, Wetzlar)
	8 g	DER (Plano, Wetzlar)
	0,4 g	S-1 (Plano, Wetzlar)
Cacodylat-Puffer	0,2 M	Natriumcacodylat (pH 7,0 bis 7,6)
	0,2 N	HCl
Kaliumpermanganat-Kontrastierer	$KMnO_4$	6% Lsg. in Cacodylat-Puffer, pH 6,5
Bleicitrat-Kontrastierer	1,33 g	$Pb(NO_3)_2$
	1,76 g	$Na(C_6H_5O_7) \cdot 2H_2O$
	gelöst in 30 ml bidestilliertem Wasser	
	8 ml 1 N NaOH	
	ad 50 ml mit bidestilliertem Wasser	
Einbettungsförmchen	Plano, Wetzlar	
200mesh-Netzchen	Plano, Wetzlar	
Petrischaleneinlage	Plano, Wetzlar	

10.8.1. Vorkontrastierung und Einbettung

Die für die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie fixierten Embryonen wurden viermal 15 Minuten in Sörensenpuffer gewaschen und anschließend zur weiteren Kontrastierung für 1 Stunde in 1% wässriger Uranylacetat-Lösung inkubiert. Überschüssiges Uranylacetat wurde viermal 15 Minuten mit Sörensenpuffer ausgewaschen bevor die Embryonen über folgende aufsteigende Alkoholreihe entwässert wurden: Je 2x 30 Minuten 30%, 50%, 70%, 80% und 90% EtOH, gefolgt von zweimaliger Inkubation für je eine Stunde in absolutem Alkohol. Im Anschluss erfolgte die Imprägnierung mit dem Einbettungsmedium über Nacht durch Inkubation mit einem 1:1 Gemisch aus absolutem Alkohol und Epon in einem offenen Gefäß unter dem Abzug. Am nächsten Morgen wurde das Gemisch durch reines Epon ersetzt und erneut für eine Stunde, nun im geschlossenen Gefäß, inkubiert.

Zur Einbettung wurden die Embryonen mit frischem Epon in kunstharzresistente Förmchen überführt und unter dem Binokular mit Hilfe einer Glasnadel in die gewünschte Position und Orientierung gebracht, bevor die Einbettungsmulden leicht überschüssig mit Epon aufgefüllt wurden. Danach wurde die Position der Embryonen nochmals unter dem Binokular kontrolliert. Die Polymerisation des Kunstharzes erfolgte für 48 Stunden bei 60°C im Wärmeschrank. Vor dem Anfertigen der Semi- und Ultradünnschnitte wurden die so erhaltenen Kunstharz-Blöckchen mindesten zwei Tage zum Auskühlen bei Raumtemperatur gelagert.

Alternativ wurde auch anstelle von Epon Spurr'sches Medium als Kunstharz verwendet, wobei die Embryonen aus dem 70%igen Alkohol direkt in Dioxan überführt und zweimal 45 Minuten inkubiert wurden. Danach erfolgte, wie auch für die Epon-Einbettung, die Imprägnierung in 1:1 Dioxan:Spurr über Nacht im offenen Gefäß unter dem Abzug. Die Einbettung in Spurr'schem Medium erfolgte am nächsten

Tag analog zur Epon-Einbettung gefolgt von 48 stündiger Polymerisation bei 60°C.

10.8.2. Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte

Die auspolymerisierten Kunstharzblöckchen wurden aus den Einbettungsförmchen gelöst und am LB-Pyramitom unter Verwendung eines Glasmessers trapezförmig zu-rechtgeschnitten. Dazu wurde zunächst das Glasmesser aus einem 38 mm breiten und 6 mm dicken entfetteten Glasstreifen mit Hilfe des LKB Knifemaker gebrochen. Danach wurden 2 bis 4 μm dicke Semidünnschnitte gewonnen. Optimale Schnitte zeigten dabei eine klar, spiegelnde Oberfläche. Anhand dieser Semidünnschnitte wurde während des weiteren Zurechtschneidens überprüft, wann die gewünschte Schnittebene im Embryo erreicht war. Dazu wurden die Schnitte vorsichtig mit der Pinzette vom Glasmesser abgenommen und auf einen Tropfen Wasser, der auf einem Objektträger vorgelegt wurde, überführt. Auf dem Strecktisch wurde der Schnitt dann durch Verdampfen des Wassers bei 60°C auf dem Objektträger fixiert und im Anschluss mit Hilfe eines Tropfens wässriger Methylenblau-Lösung angefärbt. Überschüssiges Methylenblau wurde danach vorsichtig mit Wasser ausgespült. Gegebenenfalls wurden die gefärbten Semidünnschnitte unter einem Tropfen Epon zur Auswertung am Lichtmikroskop und dauerhaften Aufbewahrung eingebettet.

Die Ultradünnschnitte, die eine Dicke von ca. 40 bis 60 nm hatten, wurden mit Hilfe eines Diamantmessers am Ultratom gewonnen. Sie wurden möglichst als zusammenhängende Serienschnitte mit 200MESH-Netzchen aus dem Wassertrog des Diamantmessers, wo optimale Schnitte als silberne Schnittbänder auf der Wasseroberfläche schwimmen, gefischt und in Petrischalen mit Gummieinlagen bis zur Kontrastierung und Auswertung gelagert.

10.8.3. Kontrastierung und Auswertung der Ultradünnschnitte

Die Netzchen mit den Ultradünnschnitten wurden zur Kontrastierung durch folgende Lösungen geführt: Cacodylat-Puffer, 2 Minuten Kaliumpermanganat, Cacodylat-Puffer zum Auswaschen des überschüssigen $KMnO_4$ -Kontrastierers, 0,02 N Natronlauge zur Äquilibrierung, 15 Minuten Kontrastierung in Bleicitrat-Lösung, Cacodylat-Puffer zum Auswaschen des überschüssigen Bleicitrates, 2x spülen in bidestilliertem Wasser.

Nach dem Abtrocknen des Wassers waren die Netzchen fertig zur direkten Auswertung am TEM.

11. Präparation, enzymatische Manipulation und Analyse von Nukleinsäuren

11.1. Isolierung genomischer DNA aus *Drosophila*

(Pirotta, 1986; Steller und Pirotta, 1986)

Tabelle 11.1.: Lösungen zur Extraktion genomischer DNA

Extraktionspuffer	100 mM	Tris/HCl (pH 9,0)
	100 mM	EDTA
	1 % (w/v)	SDS
Squi-B	10 mM	Tris (pH 8,2)
	1 mM	EDTA
	25 mM	<i>NaCl</i>

11.1.1. Isolierung genomischer DNA aus einem Fliegen-Pool

Zur schnellen Gewinnung von genomischer DNA aus *Drosophila* wurden ca. 150 Fliegen mit einem Potter in 500 ml Extraktionspuffer homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 20 Minuten im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Um die noch vorhandenen Fliegenüberreste zu beseitigen, wurde zweimal 15 Minuten lang bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die gewonnene DNA aus dem Überstand mittels einer Isopropanolfällung (s.u.) aufgereinigt.

11.1.2. Isolierung von Single-Fly-DNA

Zur Isolierung von DNA aus einer einzelnen Fliege wird diese in 50 µl Squi-B-Lösung, der 1 µl Proteinase K der Konzentration 20 mg/ml zugegeben wurde, zerkleinert. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Proteinase K durch 2-minütiges Erhitzen auf 85°C inaktiviert. Der Ansatz wird kurz anzentrifugiert, um Gewebereste am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Der Überstand wird abgenommen und entweder bei 4°C gelagert oder direkt weiter verwendet.

11.2. Fällung von Desoxyribonukleinsäuren

11.2.1. Isopropanolfällung

(Sambrook et al., 2001)

Für eine Fällung mit Isopropanol wurden zur DNA-haltigen wässrigen Lösung 0,8 Volumenteile Isopropanol gegeben, gut gemischt und 15 bis 30 Minuten bei 10°C und 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgenommen und das DNA-Pellet in 70% Ethanol 30 Minuten bei 13.000 UpM und 4°C gewaschen. Anschließend wurde erneut der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgenommen und das Pellet in der Vakuum-Heiz-Zentrifuge getrocknet. Zum Schluss wurde die so gereinigte DNA in 20 bis 40 µl sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert.

11.2.2. Ethanolfällung

(Ausubel et al., 1993; Crouse und Amorese, 1987)

Für die Ethanolfällung wurden zur wässrigen DNA-Lösung 2,5 Volumenteile absoluter Alkohol und 0,1 Volumenteile Natrium-Acid gegeben. Der Ansatz wurde mindestens 15 Minuten bei -18°C inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe entfernt worden war, wurde das entstandene Pellet in 200 µl 70% Ethanol gewaschen und in der Vakuum-Heiz-Zentrifuge getrocknet. Die so gereinigte DNA wurde in 20 bis 40 µl sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert.

11.3. Polymerasekettenreaktion

(Saiki et al. 1988)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation gewisser DNA-Fragmente. Dazu müssen die endständigen Sequenzbereiche des gewünschten Fragments bekannt sein. Nach dem Trennen der doppelsträngigen DNA-Matrize in Einzelstrang-DNA durch Aufschmelzen bei 95°C, können bei einer bestimmten optimalen und von der Basenzusammensetzung abhängigen Temperatur synthetisch hergestellte, zur Originalsequenz komplementäre, Oligonucleotide mit den endständigen Sequenzen hybridisieren (=Annealing). Im nächsten Schritt werden die Oligonucleotide entlang der DNA mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase, z.B. der *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, entlang der DNA-Matrize elongiert. Schließlich werden Matrize und Elongationsprodukt durch Erhöhung der Temperatur auf 95°C erneut in Einzelstränge getrennt und können so bei einer Wiederholung von Annealing und Elongation beide als Matrize dienen. Dadurch kommt es bei jeder zyklischen Wiederholung zur Verdoppelung des PCR-Produktes. Je nach Matrize und gewünschtem PCR-Produkt wurden zur Durchführung der Reaktion der folgende Reaktionsansatz sowie das im Anschluss aufgeführte Reaktionsprogramm angepasst.

Tabelle 11.2.: **Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion**

x μ l	Matrizen-DNA (50 bis 100ng)
1 μ l	sense-Primer (25pM)
1 μ l	anti-sense-Primer (25pM)
1 μ l	dNTP-Mix (10mM)
1 u	DNA-Polymerase
5 μ l	10x-Reaktionspuffer
10 μ l	5x-Enhancerpuffer (optional)
ad 50 μ l	<i>H₂O bidestilliert</i>

PCR-Programm:

1. Schritt: Denaturierung 300 Sekunden 95°C
2. Schritt: Denaturierung 60 Sekunden 95°C
3. Schritt: Hybridisierung 60 Sekunden X°C
4. Schritt: Elongation X Sekunden 72°C bzw. 68°C
5. Schritt: fertigstellende Elongation 600 Sekunden 72°C bzw. 68°C
6. Schritt: Lagerung ∞ 4°C

Die Hybridisierungstemperatur wurde je nach der Basenzusammensetzung und Länge der verwendeten Oligonukleotide angepasst, die Dauer der Elongation bestimmte sich aus der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Dabei wurden in der Regel je 1000 bp mit ca. 60 Sekunden gerechnet. Nach Schritt vier erfolgte ein Rücksprung zu Schritt zwei. Dieser Zyklus wurde abhängig vom gewählten Template und der gewünschten weiteren Verwendung des PCR-Produktes bis zu 36 mal wiederholt, so dass bei einer Anfangsmenge von n DNA-Matrizen eine bis zu n^{36} -fache Amplifikation erreicht werden kann.

11.4. Klonierung mit Hilfe des pCRII-TOPO-Kits

Zur Herstellung von *in-vitro*-Expressions-Klonen oder zur stabilen Generierung von Vorklonen für die weitere Verarbeitung von per PCR amplifizierten oder modifizierten DNA-Fragmenten wurde das pCRII-TOPO-Cloning-System© von Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase, die 3'-überhängend ein Desoxyadenosin anfügt, erzeugte PCR-Produkte mit dem pCRII-TOPO-TA-Cloning©-Kit verarbeitet, PCR-Produkte, die keinen Desoxyadenosin-Überhang haben, mit dem pCRII-TOPO-Blunt-Cloning©-Kit.

11.5. Herstellung chemisch-kompetenter E.coli-Bakterien

(nach Gassen und Schrimpf, 1999)

Tabelle 11.3.: Lösungen für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

SOB-Medium	2 % (w/v)	Bactotrypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	<i>NaCl</i>
	2,5 mM	<i>KCl</i>
	10 mM	<i>MgCl₂</i>
	10 mM	<i>MgSO₄</i>
RF1-Puffer	10 mM	<i>RbCl</i>
	50 mM	<i>MnCl₂</i>
	30 mM	<i>KCl</i>
	10 mM	<i>CaCl₂</i>
	15 % (v/v)	Glycerin
RF2-Puffer	10 mM	MOPS (pH6,7)
	10 mM	<i>RbCl</i>
	75 mM	<i>CaCl₂</i>
	15 % (v/v)	Glycerin

Zur Herstellung chemisch-dauerkompetenter *E.coli*-Zellen wurde Rubidium-Chlorid verwendet. Zunächst wurde in SOB-Medium eine Übernacht-Kultur mit *E.coli*-Zellen angeimpft und bei 37°C unter Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurden 250 ml SOB-Medium mit 2,5 ml der Übernacht-Kultur beimpft und wiederum unter Bewegung bei 37°C inkubiert bis eine Optische Dichte von 0,5 bis 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden 15 Minuten auf Eis ruhen gelassen, bevor sie 10 Minuten bei 4°C und 4000 UpM abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 ml RF1-Lösung resuspendiert. Nach einer erneuten Ruhephase für 15 Minuten auf Eis wurden die Zellen wiederum bei 4000 UpM und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und in 20 ml RF2-Lösung aufgenommen. Schließlich wurden die Zellen nochmals 15 Minuten auf Eis inkubiert und danach aliquotiert. Die ca. 100 µl umfassenden Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

11.6. Transformation chemisch-kompetenter E.coli-Bakterien

(Sambrook et al., 2001)

Zur Vorbereitung der Transformation eines Klonierungsproduktes in chemisch-kompetente Zellen wurde ein Aliquot kompetenter *E.coli* DH5α-Zellen auf Eis innerhalb von 30 Minuten aufgetaut. Anschließend wurde die zu transformierende

DNA dazugeben und der Transformationsansatz für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock für 30 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad mit einer unmittelbar darauf folgenden 2-minütigen Ruhephase auf Eis. Um ein Wachstum der Zellen zu erzielen wurden pro Ansatz 250 µl raumwarmes LB-Medium zugefügt bevor die Bakterien unter Bewegung mindestens 45 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Während dieser Zeit entwickeln die transformierten Zellen die zur Selektion nötige Antibiotika-Resistenz. Gleichzeitig wurden LB-Medium-Platten, denen das passende Antibiotikum zugesetzt wurde, bei 37°C angewärmt. Auf diesen wurde im Anschluss der Transformationsansatz ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

11.7. Plasmid-Präparation aus E.coli

(Birnboim und Doly, 1979)

Tabelle 11.4.: Material für die Plasmid-Präparation aus *E. coli*

<i>Nährmedium und Antibiotika:</i>		
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	1 % (w/v) Bacto-Trypton	
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt	
	85,5 mM	<i>NaCl</i>
Ampicillin	eingesetzte Konzentration 1:1000	
Kanamycin	eingesetzte Konzentration 1:2000	
Chloramphenicol	eingesetzte Konzentration 1:500	
<i>Lösungen für die Plasmid-Mini-Präparation:</i>		
S1-Lösung	50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	10 mM	<i>EDTA</i>
	100 µg/ml	RNAseA
S2-Lösung	200 mM	<i>NaOH</i>
	1 % (w/v)	SDS
S3-Lösung	2,6 M	Kaliumacetat (pH 5.2)
<i>Plasmid-Midi-Präparation:</i>		
Jet Star 2.0-Kit	Genomed, Bad Oeynhausen	

11.7.1. Alkalische-Lyse von E.coli im analytischen Maßstab

Zur Plasmid-Mini-Präparation wurden über Nacht gewachsene Bakterienkolonien von den jeweiligen LB-Medium-Platten mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 3 ml flüssigem LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum zugefügt wurde, bei 37°C unter Bewegung über Nacht kultiviert. Am nächste Morgen wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gefüllt und die Zellen 5 Sekunden bei 13.000 UpM pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl S1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl S2-Puffer und 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur ohne Bewegung erfolgte die alkalische Lyse der Zellen. Im Anschluß wurden 150 µl S3-Puffer zugegeben und der gesamte Ansatz für 20 Minuten bei 4°C und 13.000 UpM zentrifugiert. Dadurch wurde zum einen das alkalische Niveau neutralisiert, zum anderen die Proteine des Zellaufschlusses gefällt. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und die darin enthaltene DNA mit Isopropanol (s.o.) gefällt.

11.7.2. Alkalische-Lyse von E.coli im präparativen Maßstab

Für die Plasmid-Midi-Präparation wird in 50 ml LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde, eine Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37°C unter Bewegung inkubiert. Zur Präparation der Plasmid-DNA wurde das Jet-Star 2.0-Kit der Firma Genomed nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die über Nacht kultivierte Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon gefüllt und für 10 Minuten bei 4.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4 ml Lösung E1 resuspendiert. Anschließend wurde durch 5 minütige Inkubation mit 4 ml E2-Lösung die Zelllyse erreicht. Zur Neutralisation und zur Proteinfällung wurden 4 ml E3-Lösung zugegeben und der Ansatz 25 Minuten bei 4°C und 6.000 UpM zentrifugiert. Währenddessen wurde eine Anionenaustauschersäule, die zur ersten Aufreinigung der Plasmid-Präparation dienen soll, mit 10 ml E4-Lösung äquilibriert. Der Überstand der Midi-Präparation wurde auf die vorbereitete Säule gegeben. Danach wurde die Säule an die nun die Plasmid-DNA gebunden war zweimal mit je 10 ml E5-Lösung gewaschen, bevor die DNA mit 5 ml E6-Lösung von der Säule eluiert und schließlich mit Isopropanol (s.o.) gefällt wurde.

11.8. Restriktionsanalyse von DNA-Fragmenten

(Gassen und Schrimpf, 1999)

Basierend auf der Definition der Enzymeinheit Unit [U] kann die jeweils für einen Restriktionsansatz benötigte Enzymmenge nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Units}/\mu\text{g DNA} = \frac{48,5\text{kb}(\text{Größe der } \lambda\text{-DNA}) \times \text{Anzahl der Schnittstellen in der Ziel-DNA}}{\text{Größe der Ziel-DNA (kb)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen in der } \lambda\text{-DNA}}$$

Ein Restriktionsansatz umfasste jeweils 0,2 bis 5 µg Ziel-DNA mit der bestimmten Menge Enzym, sowie dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem in einem Gesamtvolumen von 20 bis 50 µl. Dieser Ansatz wurde bei der dem Enzym entsprechenden optimalen Temperatur 1 bis 2 Stunden im Wasserbad inkubiert.

11.9. Dephosphorylierung von freien 5'Enden

(Gassen und Schrimpf, 1999)

Um nach der Linearisierung von Vektormolekülen eine Religation zu vermeiden, wurden die 5'überhängigen Phosphatgruppen mit Hilfe der Calf-Intestine-Phosphatase (CIP) enzymatisch abgespalten. Dadurch sollte eine spontane Veresterung der 5' Enden mit freien 3' Enden von Vektormolekülen nicht mehr möglich sein. Nach der Linearisierung wurde die Vektor-DNA mittels einer Ethanol-Fällung von den Restriktionsenzymen befreit, in bidestilliertem sterilem Wasser aufgenommen und mit 1 U CIP sowie 1/10 Volumenteilen 10x-Reaktionspuffer versetzt. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend erneut mit Ethanol gefällt.

11.10. Ligation von DNA-Fragmenten

(nach Gassen und Schrimpf, 1999)

Zur Vorbereitung der Ligation eines linearen DNA-Fragmentes mit einem linearen Vektormolekül wurden durch entsprechende Vorbehandlung (vgl. 11.8, 11.9) bzw. durch die Verwendung entsprechender Restriktionsenzyme zunächst kompatible Enden erzeugt. Die Ligation wurde dann in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Zugabe von 2 µl 10x-Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dabei wurden 20 bis 100 ng Vektor-DNA zusammen mit einem drei- bis fünffachem molarem Überschuss von Insert-DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde bei 18°C über Nacht inkubiert und anschließend 5 Minuten auf 60°C erhitzt, um ein Abfallen der Ligase von den zirkulären Plasmiden zu bewirken.

11.11. Nukleinsäure-Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese

(nach Gassen und Schrimpf, 1999)

Tabelle 11.5.: Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

10x Auftragspuffer	0,5 % (w/v) Xylencyanol
	0,5 % (w/v) Bromphenolblau
	40 % (v/v) Glycerin in TAE oder TBE
50x TAE-Puffer	2 M Tris
	0,1 M EDTA
	25 % (v/v) 100% Essigsäure
	ad 1 L H ₂ O
10x TBE-Puffer	0,9 M Tris

Tabelle 11.5.: Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

0,9 M	Borsäure
20 mM	EDTA
ad 1 L	H ₂ O

Je nach gewünschtem Trennbereich und weiterer Verarbeitung wurden 0,8 bis 2% (w/v) Agarose in 1x-TAE oder 1x-TBE aufgekocht, 0,5 µg /µl Ethidiumbromid zugesetzt und horizontale Agarose-Gele direkt in die Elektrophorese-Kammern gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel entsprechend mit 1x-TAE bzw. 1x-TBE-Puffer überschichtet, die DNA-Probe mit 1/10-Volumenteil Auftragspuffer gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 40 bis 100 V im Gleichstromfeld. Im Anschluss wurde das Gel unter UV-Exposition analysiert und dokumentiert.

11.12. Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

(nach Angaben des Herstellers **Genomed**)

Zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen mit Hilfe des JetSorb-Kits von **Genomed**, wurden 0,8 bis 1,3% (w/v) Agarose in 1x-TAE-Puffer enthaltende Gele verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Pro 100 mg Gel wurden 300 µg Puffer A1 und 10 µl Jetsorb-Suspension hinzugefügt. Der Ansatz wurde gut gemischt und für 15 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Währenddessen wurde der Ansatz wiederholt gevortext. Die Jetsorb-Perlen, an die die DNA nun gebunden sein sollte, wurden im Anschluss bei 13.000 UpM für 30 Sekunden pelletiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun einmal für 30 Sekunden bei 13.000 UpM in 500 µl Puffer A1 und zweimal für 30 Sekunden bei 13.000 UpM in 500 µl Puffer A2 gewaschen und anschließend mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe vorsichtig getrocknet. Zur Lyse der DNA von den Jetsorb-Perlen wurde das Pellet in 20 µl sterilem, bidestilliertem Wasser resuspendiert und der Ansatz für 5 Minuten auf 50°C erhitzt. Die Perlen wurden erneut bei 13.000 UpM in 30 Sekunden pelletiert und der die DNA enthaltende Überstand abgenommen und direkt weiter verarbeitet.

11.13. Aufreinigung von DNA mit Hilfe von GFX-Säulen

(nach Angaben des Herstellers, **Amersham**)

Zur Reinigung von DNA aus einer Lösung oder zur Isolierung von sehr kleinen DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel wurde das *GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit* von **Amersham** nach Angaben des Herstellers verwendet. Die zu reinigende DNA-Lösung wurde mit 500 µl Auffang-Puffer gemischt bzw. das aus dem Gel ausgeschnittene DNA-Fragment in 500 µl Auffang-Puffer bei 60°C für 15 Minuten geschmolzen. Mit diesem Ansatz wurde die GFX-Säule beladen, in das passende Sammelgefäß gestellt und 30 Sekunden bei 13.000 UpM zentrifugiert. Anschließend

wurde die Säule mit 500 μ l Waschpuffer beladen und erneut bei 13.000 UpM für 30 Sekunden zentrifugiert. Schließlich erfolgt die Elution der DNA von der Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß durch Waschen mit 20 bis 50 μ l sterilem bidestilliertem Wasser bei 13.000 UpM für 60 Sekunden.

11.14. Sequenzanalyse

Die Sequenzanalysen von DNA-Plasmiden bzw. PCR-Produkten wurden als Auftragsarbeiten von der Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt.

12. Präparation und Analyse von Proteinen

12.1. Extraktion von Proteinen aus *Drosophila*-Embryonen

(Sambrook et al., 2001)

Tabelle 12.1.: Lysis-Puffer für die Proteinextraktion aus Embryonen

Lysis-Puffer	50 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	150 mM	<i>KCl</i>
	5 mM	<i>MgCl</i>
	0,25 mM	Saccharose
	0,1 mM	DTT
	1 mM	PMSF
High Salt Lysis	500 mM	<i>NaCl</i>
	50 mM	Tris (pH 8.0)
	1 % (v/v)	NP-40
Low Salt Lysis	50 mM	Tris (pH 8.0)
	1 % (v/v)	NP-40

Zur Proteinextraktion wurden Embryonen der gewünschten Stadien gesammelt, entchorionisiert, erneut in TNX gewaschen und schließlich möglichst ohne Flüssigkeit in 15 ml Flacons überführt. Unter Zugabe des zweifache Volumens des gewünschten Lysis-Puffers wurden die Embryonen in dem Falcon mit einem Potter zerkleinert und der Ansatz anschließend 20 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Um Gewebereste und Zellkerne vom gewünschten Lysat zu trennen wurde zunächst 5 Minuten bei 1000 UpM und 4°C und danach 15 Minuten und 3000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Dabei wurde jeweils der Überstand abgenommen und in ein frisches Falcon überführt, das Pellet jeweils verworfen.

12.2. *in-vitro*-Transkription mit dem TNT-System

(nach Angaben des Herstellers, Promega)

Die *in-vitro*-Expression von Proteinen wurde mit Hilfe des gekoppelten *in-vitro*-Transkription-Translations-Systems TNT7© von Promega nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von biotinkgekoppelter Transcendent tRNA durchgeführt. In einem Volumen von 50 µl wurden 1 µg zirkulärer Plasmid-DNA, 1 µl T7 RNA-

Polymerase, 1 μ l 1 mM Aminosäuregemisch ohne Methionin, 1 μ l 1mM Methionin, 1 μ l Transcendent tRNA, 1 μ l RNase-Inhibitor (RNase Out von **Quiagen**), 2 μ l Reaktionspuffer und 25 μ l Kaninchen-Retikulozytenlysatsat gemischt. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 30°C inkubiert, die Reaktion im Anschluss durch zweiminütiges Inkubieren auf Eis gestoppt.

12.3. *in-vitro*-Phosphorylierungs-Test

in-vitro-exprimierte konstitutiv-aktive Abelson-Kinase wurde mit anderen zu testenden *in-vitro*-exprimierten Proteinen in einem Gesamtvolumen von 30 μ l, dem 5 μ l eines 1mM ATP-Stock zugefügt wurden, gemischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das Ergebnis wird im Western-Blot mit Hilfe eines α -Phospho-Tyrosin-Antikörpers analysiert.

12.4. Bradford-Test

(nach Gassen und Schrimpf, 1999)

Zur Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe wurden jeweils 1 μ l bzw. 5 μ l der Probe mit 800 μ l destilliertem Wasser und 200 μ l **Bio-Rad-Protein-Assay®-Reagent** vermengt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Danach wurde die Optische Dichte bei 595 nm bestimmt und mit einer Standardkurve, die den Proteingehalt in mg/ml gegenüber der OD beschreibt, verglichen.

12.5. Immunpräzipitation

(Harlow und Lane, 1988)

Tabelle 12.2.: **Material für die Immunpräzipitation**

Protein-A-Sepharose		Roth, Karlsruhe
Puffer IP1	50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	1 mM	EDTA
	0,5 % (v/v)	Triton 100
	1 Tablette / 10 ml	Protease-Inhibitor-Mix
Puffer IP2	500 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	1 mM	EDTA
	0,5 % (v/v)	Triton 100
	1 Tablette / 10 ml	Protease-Inhibitor-Mix

Zur Vorbereitung der Immunpräzipitation wurden 50 μ l Protein-A-Sepharose zweimal in IP1-Puffer gewaschen und anschließend mit 1 bis 10 μ l Antikörper 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch erneutes Waschen mit IP1-Puffer entfernt. Für die eigentliche Immunpräzipitation wurden 20 μ l der so vorbereiteten Antikörper gekoppelten Protein-A-Sepharose mit dem gewünschten Lysat über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Ansatz bei 13.000 UpM und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit IP2-Puffer gewaschen und schließlich in 20 bis 100 μ l nicht-reduktivem SDS-Gel-Probenpuffer (s. SDS-Page) oder in Laemmli-Puffer (s. SDS-Page) aufgenommen, bei 85°C kurz erhitzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt auf einem SDS-Gel analysiert oder bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

12.5.1. Klären des Lysates

Wenn ein starker unspezifischer Hintergrund zu befürchten war, wurde das Lysat vor der Immunpräzipitation geklärt. Dazu wurde es mit 50 μ l Kaninchen-Serum vermischt und eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 20 μ l in IP1-Puffer gewaschener Protein-A-Sepharose zugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 UpM und 4°C für 5 Minuten wurde der Überstand erneut mit 20 μ l der gewaschenen Protein-A-Sepharose inkubiert. Für die eigentliche Immunpräzipitation wurde der nach erneuter Zentrifugation abgenommene Überstand eingesetzt.

12.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

(Laemmli, 1970)

Tabelle 12.3.: Materialien für die SDS-Page

Trenngelpuffer, 4x	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris/HCl (pH 8,8) SDS
Sammelgelpuffer, 4x	0,5 M 0,4 % (w/v)	Tris/HCl (pH 6,8) SDS
Acrylamidmix		Premixed, Biometra, Göttingen
Probenpuffer, 2x	50 mM 20 % (v/v) 4 % (w/v) 4 % (v/v) 0,2 % (w/v)	Tris/HCl (pH 6,8) Glycerin SDS β -Mercaptoethanol Bromphenolblau
Laufpuffer	1,9 M	Glycin

Tabelle 12.3.: SDS-Page
 0,25 M Tris
 1 % (w/v) SDS

Sammelgel (5%)	4,6 ml	H_2O
	0,8 ml	40% Acrylamidmix
	820 μ l	Sammelgelpuffer
	60 μ l	10% Ammoniumpersulfat
	6 μ l	TEMED
Trenngel	8%	10%
	6,6 ml	4,9 ml H_2O
	2,0 ml	2,4 ml 40% Acrylamidmix
	2,6 ml	2,6 ml Trenngelpuffer
	100 μ l	100 μ l 10% Ammoniumpersulfat
	6 μ l	6 μ l TEMED

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden diskontinuierliche Polyacrylamid-Gele unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) verwendet. Zwischen zwei gereinigten fettfreien Glasplatten wurde zunächst das Trenngel in der gewünschten Konzentration gegossen und mit Wasser überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Dabei wurde das Trenngel umso höherprozentig gewählt, je kleiner die aufzutrennenden Proteine sind. Sobald das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Das fertige Gel wurde in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und diese mit 1x Laufpuffer gefüllt. Vor dem Auftragen wurde schließlich die Proteinprobe 1:1 mit 2x Probenpuffer gemischt und für 5 Minuten bei 90°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 bis 150 V im Gleichstromfeld.

12.7. Coomassie-Protein-Nachweis

(nach Gassen und Schrimpf, 1999)

Tabelle 12.4.: Lösungen für den Protein-Nachweis mit Coomassie-Blue

Coomassie-Färbelösung	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig
	1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau
Entfärber	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig

Um aufgetrennte Proteine direkt im Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen wurde das Gel, ggf. nach der Durchführung eines Western-Blots, 20 bis 30 Minuten unter Bewegung in Coomassie-Färbelösung getränkt. Im Anschluss wurde überschüssige Farbe so lange mit Entfärber-Lösung ausgespült bis die Proteinbanden möglichst hintergrundfrei sichtbar waren. Das so gefärbte Gel wurde zweimal in Wasser gewaschen und gegebenenfalls die gewünschte Proteinbande zur weiteren Analyse mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten.

12.8. Western-Blot

(nach Gassen und Schrimpf, 1999)

Tabelle 12.5.: Materialien und Lösungen für den Western-Blot

Semi-Dry-Transferpuffer	25 mM	Tris
	150 mM	Glycin
	10 %(v/v)	Methanol
TBS	10 mM	Tris/HCl (pH 7,7)
	150 mM	<i>NaCl</i>
TBSTT	1 x	TBS
	0,05 %(v/v)	Tween 20
	0,2 %(v/v)	TritonX-100
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel	
PVDF-Membran	Hybond-P, Amersham, Braunschweig	

Zur immunologischen Analyse der diskontinuierlich im Polyacrylamid-Gel getrennten Proteine wurden diese zunächst wie folgt auf eine Poly-Vinyliden-Duofluorid-Membran transferiert: Das Sammelgel wurde entfernt und das die Proteine enthaltende Trenngel 10 Minuten in Semi-Dry-Transferpuffer gespült. Gleichzeitig wurden 2x8 Stück Whatman-Papier, die exakt die Größe des Gels hatten ebenfalls in Semi-Dry-Transferpuffer getränkt. Auch die PVDF-Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und zuerst in Methanol äquilibriert und dann in Semi-Dry-Transferpuffer geschwenkt. In der Blotting-Apparatur wurden 8 der Whatman-Papiere auf die Kathode gestapelt, gefolgt von der Membran, dem genau ausgerichteten Gel und weiteren 8 Whatman-Papieren, sowie schließlich der Anode. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA pro cm² Gelfläche für eine Stunde. Im Anschluss wurde das Gel zur Kontrolle mit Coomassie (s. 12.7) gefärbt. Die PVDF-Membran wurde mit der Protein-Seite nach oben für 10 Minuten in TBS gewaschen und 1 Stunde in TBS mit 5% Milchkpulver geblockt. Danach wurden Milchkpulverreste während jeweils 10

Minuten erst mit TBSTT und dann mit TBS weggespült, bevor die Inkubation mit dem Erst-Antikörper bei 4°C über Nacht erfolgte. Überschüssiger Erst-Antikörper wurde durch dreimaliges jeweils 10 Minuten dauerndes Waschen in TBS entfernt und die Membran anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweit-Antikörper inkubiert. Nach vier weiteren 10-minütigen Wasch-Schritten in TBSTT erfolgt der Nachweis der gebundenen Zweit-Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits wie folgt: Je 10 cm² Membran wurden 0,5 ml 1:1 Gemisch der beiden ECL-Reagenzien auf einen aufgeschnittenen Autoklavenbeutel pipettiert und die Membran darin getränkt. Anschließend wurde die Membran in einem frischen Autoklavenbeutel gelagert, um ein Austrocknen zu verhindern. Die entstehende Chemolumineszenz wurde mittels Autoradiographie detektiert.

12.8.1. Detektion von biotinylierten Proteinen im Western-Blot

Um *in-vitro*-transkribierte biotinylierte Proteine im Western-Blot zu detektieren, wurde die PVDF-Membran nach dem Blocken in 5%-Milchpulver/TBS zweimal für 10 Minuten in TBS gewaschen. Gleichzeitig wurde ein Ansatz aus 15 ml TBS mit je 15 µl Lösung A und Lösung B des Vectastain-Elite-Kits präinkubiert. Im Anschluss wurde die Membran für 1 Stunde mit der AB-Lösung bedeckt bei Raumtemperatur bewegt. Überschüssige HRP-Komplexe der Lösung wurden durch viermaliges Waschen für 10 Minuten in TBSTT entfernt, bevor die Membran wie oben beschrieben mit dem ECL-Kit behandelt und die Chemolumineszenz per Autoradiographie nachgewiesen wurde.

12.9. MALDI-Tof

Die MALDI-Tof Analyse wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Lingelbach durch Dr. J. Nyalwidhe durchgeführt.

Teil III.

Ergebnisse

13. Entwicklung der Mitteldarm-Ringmuskeln

13.1. Morphologie der Mitteldarm-Muscularis

13.1.1. Morphologie der Mitteldarm-Muscularis von *Drosophila melanogaster*

Die meisten aktuellen Arbeiten (vgl. Einleitung, S. 15) beschreiben die Mitteldarm-Muscularis von *Drosophila* als eine innere Schicht zirkulärer Muskeln, die von einer äußeren Schicht longitudinaler Muskeln umfasst wird. Im Gegensatz dazu konnte hier mit Hilfe von Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM) an präparierten Därfen dritter Larven (Abb. 13.1) gezeigt werden, dass es sich vielmehr um zwei miteinander verwobene Schichten von Muskeln handelt. Dabei tritt deutlich die netzförmige Gestalt der zweikernigen Ringmuskeln zu Tage (Abb. 13.1, C, vgl. Kapitel 1). Bei der weiteren Beschreibung dieser Struktur werden im Folgenden die Teile des Syncytiums, die die Zellkerne enthalten, als Zellkörper und die netzförmig arrangierten Verbindungen dazwischen als Strings bezeichnet.

Wie oben dargestellt (vgl. Kapitel 1) umspannen jeweils zwei zirkuläre Muskeln als gegenüberliegendes Paar das Darmrohr. Die mehrkernigen longitudinalen Muskeln verlaufen parallel zueinander (Abb. 13.1, A, B, C LM) und abwechselnd über und unter den Ringmuskeln (Abb. 13.1, B, Pfeil: longitudinaler Muskel über den zirkulären,

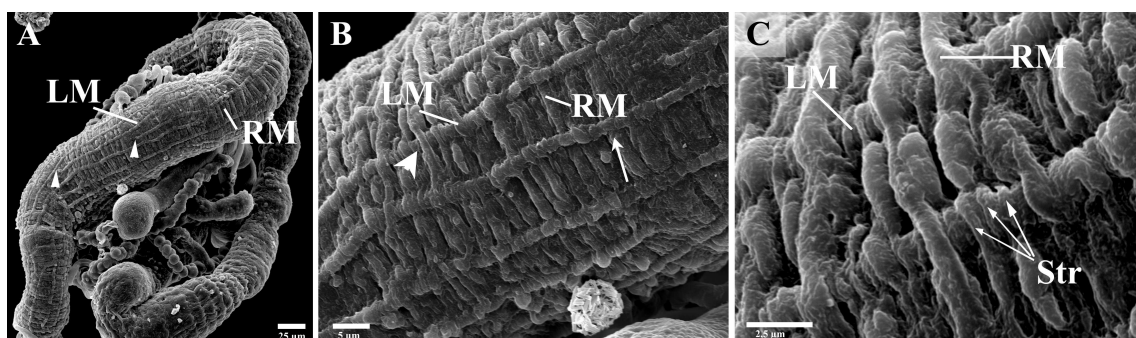


Abbildung 13.1.: Morphologie der Mitteldarm-Muscularis von *Drosophila melanogaster*: A, B, C REM, Darmpräparat dritter Larven. A Der Mitteldarm ist von einem Muscularis-Gewebe aus zirkulären und longitudinalen Muskeln umgeben, Pfeil = Ende eines longitudinalen Muskels, Balken = 25 μm . B Die zirkulären Muskeln können unterhalb (Pfeil) oder oberhalb (Pfeilkopf) der longitudinalen Muskeln verlaufen, Balken = 5 μm . C Die zirkulären Muskeln sind durch Strings (Str) netzförmig gestaltet, RM = zirkulärer Muskel, LM = longitudinaler Muskel, Balken = 2,5 μm .

Pfeilkopf: longitudinaler Muskel unter den zirkulären), wobei sie teilweise sogar in die Maschen einzelner Ringmuskeln verwebt erscheinen (Abb. 13.1, C). Auffällig ist, dass sie nicht in allen Fällen entlang des gesamten Mitteldarmes elongiert sind (Abb. 13.1, A, Pfeilköpfe).

Auch die Mitteldarm-Muscularis adulter Fliegen besteht aus miteinander verwobenen zirkulären und longitudinalen Muskeln (Abb. 13.2, A). Es fällt jedoch auf, dass die longitudinalen Muskeln im Verhältnis zu den zirkulären Muskeln wesentlich feiner gestaltet sind, als es in den Larven-Stadien der Fall ist. Ausserdem wechseln sie wesentlich häufiger ihre Position von innerhalb der zirkulären Muskeln nach ausserhalb und zurück (Abb. 13.2, B, vgl. Abb. 13.1, B, C). Während die longitudinalen Muskeln in den larvalen Stadien als massive Syncytien erscheinen, können sie in den adulten Fliegen Quervernetzungen aufweisen (Abb. 13.2 C, Pfeile), die während der Metamorphose entstehen (Klapper et al., 2001). Auch der Aktin-Nachweis zeigt, dass in der adulten Mitteldarm-Muscularis gegenüber der larvalen Mitteldarm-Muscularis die zirkulären Muskeln trotz ihrer Netzstruktur mächtiger erscheinen als die longitudinalen Muskeln (vgl. Abb. 13.2, D und Abb. 13.2, E). Deutlich zu erkennen sind dabei die im Aktin-Nachweis ausgesparten Verbindungen zwischen den terminalen Z-Scheiben der Ringmuskeln, die sich wie eine Naht entlang des Mitteldarmes und parallel zu ihrer auf der anderen Darmseite gegenüberliegenden Naht erstreckt (Abb. 13.2, D, Pfeilköpfe). Ein Doppel-Fluoreszenz-Nachweis von Aktin und Chromatin zeigt schließlich neben der Netzwerkstruktur der zirkulären Muskeln, dass in das Muscularis-Gewebe Nester intestinaler Stammzellen eingelagert sind (O'Brian et al., 2006). Diese sind deutlich an der hohen Anzahl von Zellkernen zu erkennen und dienen als Reservoir für den Mitteldarm (Abb. 13.2, E, Pfeile).

13.1.2. Morphologie der Mitteldarm-Muscularis von *Schistocerca gregaria* und *Manduca sexta* im Vergleich zu *Drosophila melanogaster*

Da die vernetzte Struktur der Mitteldarm-Muscularis zunächst ungewöhnlich erschien, wurden weitere Insekten-Arten, nämlich die hemimetabole vorderasiatische Wanderheuschrecke *Schistocerca gregaria* (Orthoptera:Caelifera:Acrididae) und der holometabole Tabakschwärmer *Manduca sexta* (Lepidoptera:Sphingidae), zum Vergleich herangezogen. Dabei war bereits bekannt, dass die Mitteldarm-Muscularis adulter Wanderheuschrecken aus drei Schichten von Muskeln besteht (Chapman, 1999). Zur Vergleichbarkeit mit den untersuchten *Drosophila*-Larven wurden in die-

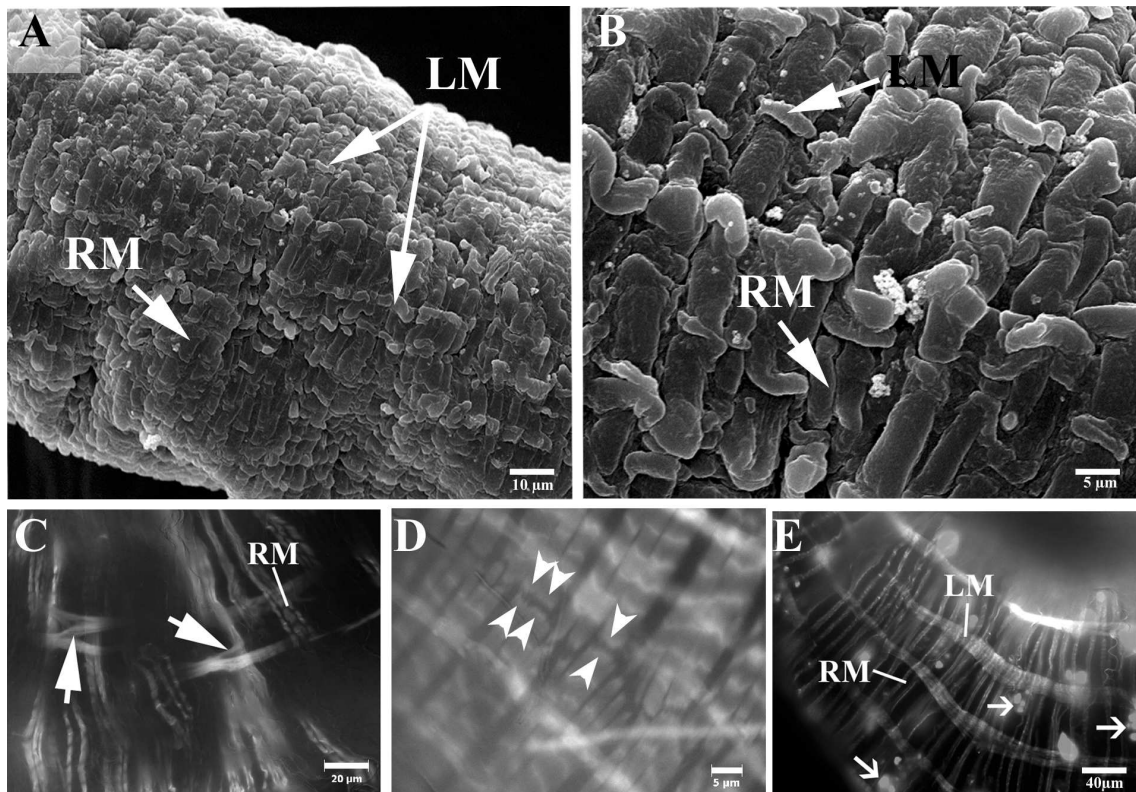


Abbildung 13.2.: Mitteldarm-Muscularis adulter und larvaler *Drosophila melanogaster* im Vergleich: A, B REM, Darmpräparat adulter Fliegen. C,D TRITC-Phalloidin-Nachweis von Aktin-Fasern in der Mitteldarm-Muscularis adulter *Drosophila*, Darmpräparate. E TRITC-Phalloidin-Nachweis von Aktin-Fasern und Chromatin-Nachweis mit DAPI, Darmpräparat dritte Larve. A, B Die longitudinalen Muskeln erscheinen im Vergleich zu den zirkulären Muskeln feiner und engmaschiger mit der Ringmuskulatur verwoben als in den Larvenstadien, Balken in A = 10 µm, Balken in B = 5 µm. C Pfeil: Die longitudinalen Muskeln können Quervernetzungen haben, Balken = 20 µm. D Pfeilköpfe: Regelmäßig angeordnete Verknüpfungen der terminalen Z-Scheiben, Balken = 5 µm. E Pfeile: Nester intestinaler Stammzellen, RM = zirkulärer Muskel, LM = longitudinaler Muskel, Balken = 40 µm.

sem Zusammenhang jedoch ebenfalls Larvenstadien beider Arten untersucht.

Mit Hilfe von TRITC-Phalloidin-Nachweisen an präparierten Därfen von *Schistocerca*-Larven wurde festgestellt, dass die Organisation der larvalen Mitteldarm-Muscularis derjenigen der adulten Mitteldarm-Muscularis von *Schistocerca* entspricht. Sie gliedert sich in eine äußere Schicht sehr prominenter Längsmuskeln (Abb. 13.3, G), gefolgt von einer mittleren Schicht Ringmuskeln (Abb. 13.3, H) und einer inneren Schicht kurzer und sehr feiner, teilweise fächerförmig angeordneter longitudinaler Muskeln (Abb. 13.3, I). Es treten keine Verflechtungen der Schichten miteinander auf.

Bei *Manduca*-Larven findet sich im Vergleich zu *Drosophila* eine hohe Anzahl sehr

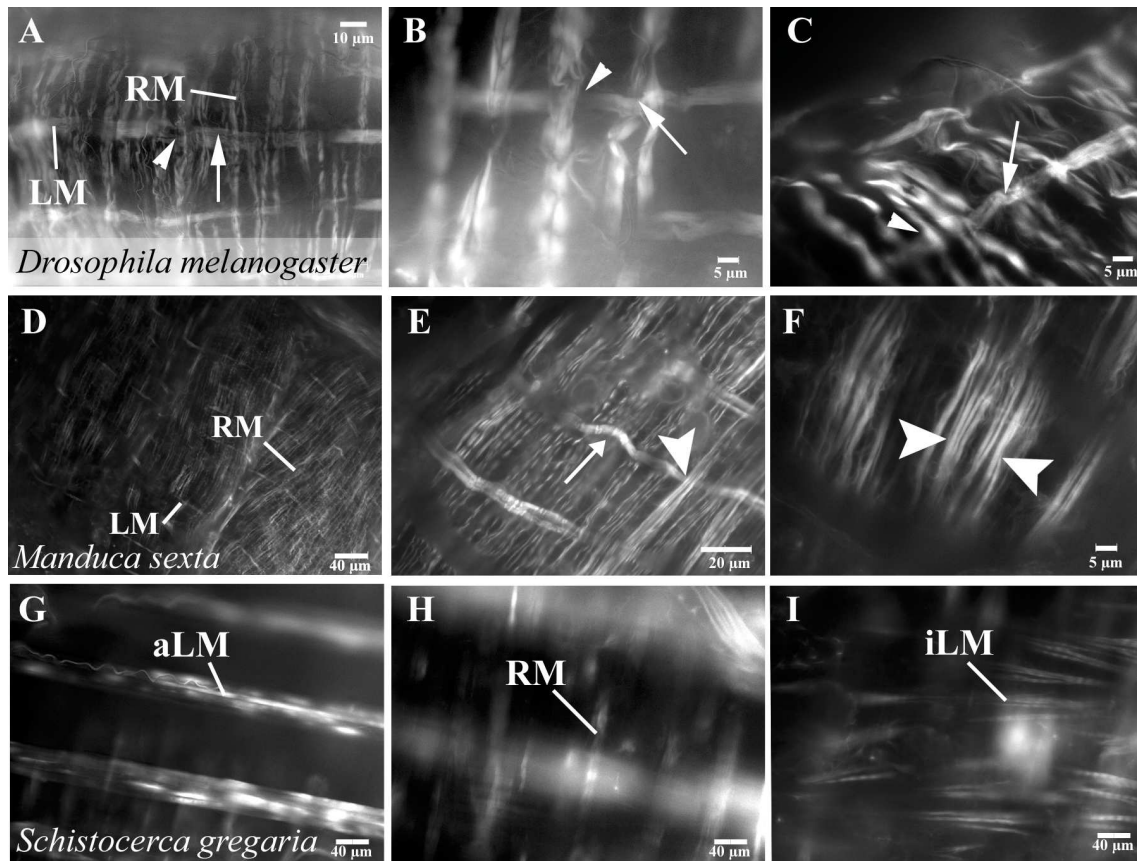


Abbildung 13.3.: Morphologie der Mitteldarm-Muscularis von *Drosophila melanogaster* im Vergleich mit *Manduca sexta* und *Schistocerca gregaria*: A - I TRITC-Phalloidin-Nachweis an präparierten Därfen von larvalen Stadien. A - C *Drosophila melanogaster*, zirkuläre und longitudinale Muskeln sind regelmäßig miteinander verflochten, Pfeilkopf: longitudinale Muskeln unterhalb der zirkulären, Pfeil: longitudinale Muskeln oberhalb der zirkulären, Balken in A = 10 μm , Balken in B und C = 5 μm . D - F *Manduca sexta*. D, E zirkuläre und longitudinale Muskeln sind miteinander verwoben, Pfeilkopf: longitudinaler Muskel unterhalb der zirkulären, Pfeil: longitudinaler Muskel oberhalb der zirkulären, Balken in D = 40 μm , Balken in E = 20 μm . F Pfeilköpfe: Quervernetzungen der zirkulären Muskeln, Balken = 5 μm . G - I *Schistocerca gregaria*, die drei Muskelschichten sind nicht miteinander vernetzt, G Fokus auf die aLM = äußere longitudinale Muskeln, Balken = 40 μm H Fokus auf die RM = zirkuläre Muskeln, Balken = 40 μm I Fokus auf die iLM = innere longitudinale Muskeln, Balken = 40 μm .

feiner und kurzer Längsmuskeln (Abb. 13.3, D). Es ist deutlich zu erkennen, dass diese mit den Ringmuskeln verwoben sind (Abb. 13.3, E, Pfeil: longitudinaler Muskel oberhalb der Ringmuskeln, Pfeilkopf: longitudinaler Muskel unterhalb der Ringmuskeln). Auffällig ist, dass es sich bei den Ringmuskeln von *Manduca* ebenfalls um zumindest quervernetzte Muskeln handelt (Abb. 13.3, F, Pfeilköpfe weisen auf Punkte an denen sich verschiedene Aktinfasern verzweigen). Dabei sind die einzelnen nachweisbaren Aktin-Bündel wesentlich feiner und der einzelne Muskel besteht

aus wesentlich mehr Aktin-Bündeln als ein Ringmuskel von *Drosophila*. Das Verflechtungsmuster erscheint über den gesamten Mitteldarm insgesamt gleichmäßig, wenn auch durch die feinere Gestalt der longitudinalen Muskeln nicht so regelmäßig wie bei *Drosophila* (vgl. Abb. 13.3, A-C und D, E).

Sowohl bei *Manduca* als auch bei *Schistocerca* bleibt unklar, ob es sich bei den viszerale Muskeln um mono- oder bi- bzw. multinukleäre Muskeln handelt. Darüberhinaus erscheint das Aktin-Muster bei *Schistocerca* nicht mit einer Querstreifung vereinbar, sondern erinnert eher an die schräggestreifte Muskulatur der Anneliden.

13.2. Ultrastrukturelle Analyse der Fusion der Ringmuskel-Founder-Zellen mit den fusionskompetenten Myoblasten

Im Zentrum dieses Abschnittes steht die Frage nach der Entwicklung der zweikernigen Mitteldarm-Ringmuskeln von *Drosophila*. Dabei ist zunächst zu klären, auf welche Weise die beteiligten Zellen miteinander fusionieren.

Im späten Stadium 10 der Embryonalentwicklung von *Drosophila* sind die Zellen des viszerale Mesoderms, mit Ausnahme der longitudinalen Founder-Zellen, vollständig eingewandert und im Bereich des anterioren und posterioren Mitteldarmprimordiums als Nachbarzellen des Endoderms zu finden. Dabei sind die verschiedenen Zelltypen anhand ihrer Position und Zellform deutlich zu erkennen (vgl. Abb. 5.1, Seite 36). Die zirkulären viszerale Founder-Zellen sind als einzelliges Band von anterior nach posterior angeordnet und befinden sich ventral der fusionskompetenten Myoblasten. Diese sind in ihrer Form deutlich runder als die zirkulären Founder-Zellen und bilden ein mehrzelliges Band, das zu Beginn von Stadium 10 die ursprüngliche Clusterung noch erkennen lässt. In dieser Situation stellt sich der Fusionsprozess wie folgt im Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM) dar:

13.2.1. Die Fusion der zirkulären Founder-Zellen mit den fusionskompetenten Myoblasten findet nur partiell statt

Im späten Stadium 10 wird ein Kontakt zwischen der zirkulären Founder-Zelle und der fusionskompetenten Myoblaste hergestellt (Abb. 13.4, A, Pfeil). Im Verlauf des frühen Stadium 11 verdichtet sich dieser Kontakt zu einer elektronenoptisch dichten Struktur (Abb. 13.4, B, höhere Vergrößerung in C, Pfeil). Dabei ist die Ausrichtung

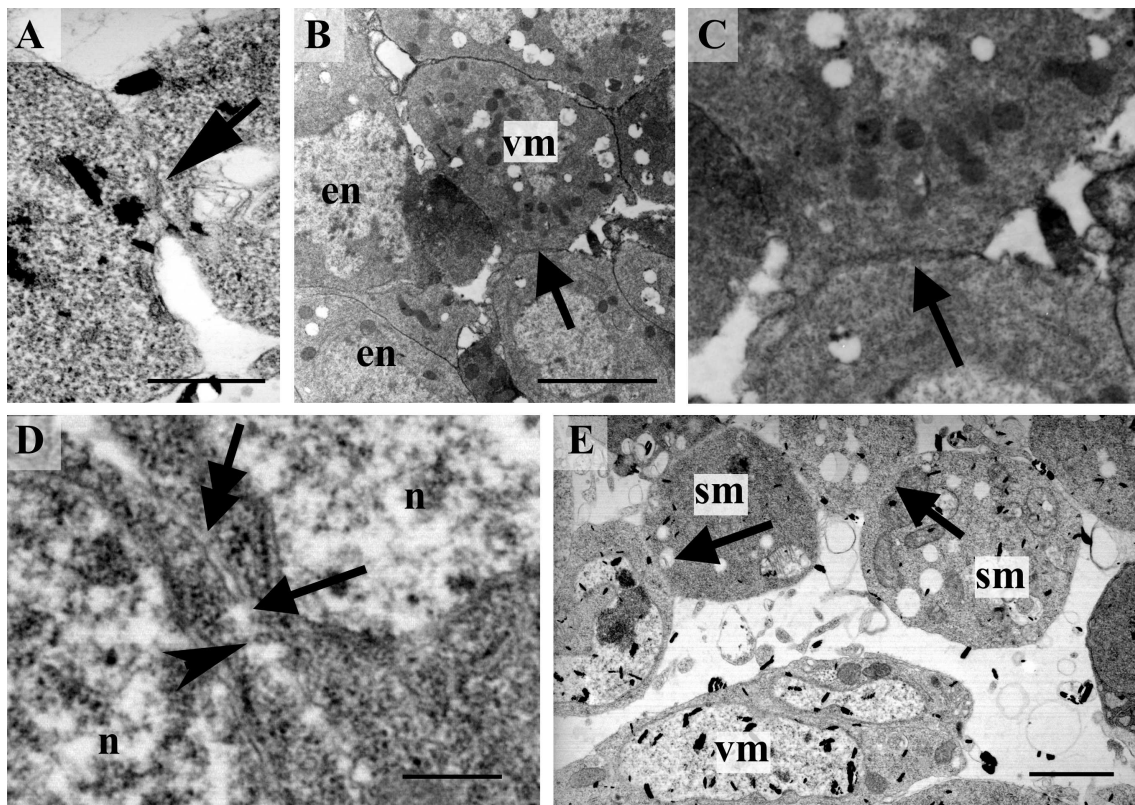


Abbildung 13.4.: Fusion der zirkulären viszeren Founder Zellen mit den fusionskompetenten Myoblasten und Vergleich mit dem ersten Schritt der somatischen Fusion: A-E Transmissions-Elektronen-Mikroskopie an Querschnitten von Embryonen der Stadien 10 bis 13. **A** In Stadium 10 bildet sich der Kontakt (Pfeil) zwischen fusionskompetenter Myoblaste und zirkulärer Founder- Zelle, Balken = 200 nm. **B** frühes Stadium 11, die Kontaktstruktur wird wesentlich verdichtet (Pfeil) die Ausrichtung ist ca. 90° zum benachbarten Endoderm (en), Balken = 2 μ m. **C** Ausschnittsvergrößerung von B, Pfeil weist auf Kontaktstruktur. **D** Stadium 11, Membranzusammenbruch, der Pfeilkopf weist auf vesikulierte Membranfragmente zwischen den beiden Zellen, Pfeil = Bereich der nach der Fusion frei von elektronendichtem Material ist, Doppelpfeil = persistierende Membranen Balken = 150 nm. **E** Stadium 12, Der Kontakt zwischen Founder-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten im somatischen Mesoderm (Pfeil weist auf Kontaktstruktur) erinnert an den Kontakt der Zirkulären viszeren Founder-Zelle mit ihrer fusionskompetenten Myoblaste (vgl. B und C), Balken = 2 μ m. en = Endoderm, n = Nukleus, vm = viszerales Mesoderm, sm = somatisches Mesoderm.

der Zellen und der Kontaktstelle in Bezug auf das benachbarte Endoderm immer gleich, bedingt durch die ausgänglich ventrale Position der Founder-Zelle in Bezug auf das Band der fusionskompetenten Myoblasten. Ausserdem ist die elektronenoptisch dichte Kontaktstelle weder mit elektronendichten Vesikeln assoziiert noch mit den elektronendichten Plaques der somatischen Myoblastenfusion vergleichbar. Innerhalb der verdichteten Kontaktstelle bricht im Anschluss während Stadium 11 die Membran zwischen den beiden Zellen stellenweise zusammen. Es sind vesikelförmig

abgeschnürte Membranstücke erkennbar (Abb. 13.4, D, Pfeilkopf), die in von elektronendichtem Material freien Bereichen liegen (Abb. 13.4, D, Pfeil). Direkt daneben erscheinen beide Zellmembranen jedoch intakt (Abb. 13.4, D, Doppelpfeil). Diese intakten Stellen persistieren während der weiteren Entwicklung der Ringmuskeln, so dass die Fusion nicht zu einem vollständig durchgängigen Syncytium führt. Dieser Vorgang wird im Folgenden als partielle Fusion der zirkulären viszerale Myoblasten bezeichnet. Während des gesamten Prozesses können weder elektronendichte Vesikel noch elektronendichte Plaques beobachtet werden, die mit den Strukturen während der somatischen Myoblastenfusion vergleichbar wären (vgl. 2., Seite 19, Abb. 16.4, Seite 112).

13.2.2. Ultrastruktureller Vergleich der ersten somatischen Fusion und der Fusion der Ringmuskel-Founder-Zelle mit ihrer fusionskompetenten Myoblaste

An allen 30 untersuchten Wildtyp-Embryonen des frühen Stadiums 12 bis zum späten Stadium 13 wurde beobachtet, dass die Fusion der somatischen Founder-Zelle mit den ersten ein bis zwei fusionskompetenten Myoblasten ebenfalls ohne Präfusionskomplex und elektronendichte Plaques abläuft. Vielmehr bildet sich hier zwischen der Founder-Zelle und der fusionskompetenten Myoblaste eine Kontaktstruktur, die stark an die oben beschriebene Kontaktstruktur im viszerale Mesoderm erinnert (13.2.1 Abb. 13.4, E, Pfeile, vgl. Abb. 13.4, B). Erst bei den Fusionen der mindestens drei Kerne enthaltenden Precursor-Zelle mit weiteren fusionskompetenten Myoblasten des somatischen Mesoderms konnten die genannten Strukturen festgestellt werden, wie sie bei Doberstein et al. (1997) beschrieben werden. Dies ist ein weiterer deutlicher Hinweis darauf, dass es sich im somatischen Mesoderm in der Tat um zwei distinkt getrennte Fusionsschritte handelt. Daran anschließend stellt sich die Frage, in wie weit der erste somatische Fusionsschritt homolog zur Fusion der zirkulären viszerale Founder-Zelle mit den viszerale fusionskompetenten Myoblasten zu sehen ist (siehe Kapitel 21).

13.3. Entwicklung der Netzstruktur der Ringmuskeln

Nachdem die beteiligten Zellen fusioniert sind, bleibt zu klären, auf welche Weise die syncytialen Ringmuskeln ihre einzigartige netzförmige Gestalt erhalten.

13.3.1. Entwicklung der Netzstruktur der Ringmuskeln im Lichtmikroskop

Im Lichtmikroskop kann die Entwicklung der Netzstruktur, die die Gestalt der Ringmuskeln bestimmt, ab dem Stadium 13 der Embryonalentwicklung beobachtet werden (Abb. 13.5, A, E). Die Zellkörper sind in zwei mehr oder weniger gleichmäßigen Reihen angeordnet (Abb. 13.5, E Sterne), und während sich die Syncytien dorso-ventral entlang des Endoderms strecken werden die Strings als fädige Strukturen zwischen den beiden Reihen sichtbar (Abb. 13.5, E Pfeile). Je weiter diese Streckung der Ringmuskeln um das sich bildende Darmrohr während der Stadien 13 und 14 fortschreitet (Abb. 13.5, B, C, F), um so feiner und faseriger werden die Strings (Abb. 13.5, C, F, Pfeile). Schließlich ist ab dem Stadium 15 das auch in den Larven zu beobachtende Geflecht aus zirkulären und longitudinalen Muskeln im Lichtmikroskop sichtbar (Abb. 13.5, D, Pfeile deuten auf Kreuzungspunkte zwischen zirkulären und longitudinalen Muskeln).

Die nicht zur Bildung der Ringmuskeln benötigten fusionskompetenten Myoblasten werden - deutlich sichtbar ab Stadium 14 - von den sich streckenden Syncytien überlagert (Abb. 13.5, C, F) und dienen anschließend als Pool für die Bildung der longitudinalen Muskeln. Unklar ist dabei noch, auf welchem Weg die longitudinalen Muskeln fusionieren und wie letztlich die Verflechtung der beiden Muskeltypen stattfindet.

13.3.2. Entwicklung der Netzstruktur der Ringmuskeln im TEM

Da im TEM die Auflösung feiner ist und da der Zugang zu dem zu untersuchenden Gewebe im Querschnitt direkter als bei der Analyse von *whole-mount*-Präparaten möglich ist, ist der Beginn der Netzbildung hier bereits zu einem früheren Stadium als im Lichtmikroskop beobachtbar. Noch im mittleren Stadium 12 sind deutlich die palisadenförmigen Zellen des sich zum Tubus schließenden Endoderms erkennbar (Abb. 13.6, A, en = Endoderm). Entlang dieses Gewebes strecken sich nun die fusionierten zweikernigen Syncytien in dorso-ventraler Richtung. Dabei nehmen sie zunächst eine spindelförmige Gestalt an (Abb. 13.6, A, markiertes Syncytium). Im weiteren Verlauf entfernen sich die Zellkörper kontinuierlich von einander, bis sie ungefähr eine Distanz von einem Viertel des Darmumfangs erreicht haben. Währenddessen werden ab dem Übergang von Stadium 12 zu Stadium 13 die Strings, die das Netzwerk bilden, in der Mitte dazwischen deutlich sichtbar. Im Querschnitt erschei-

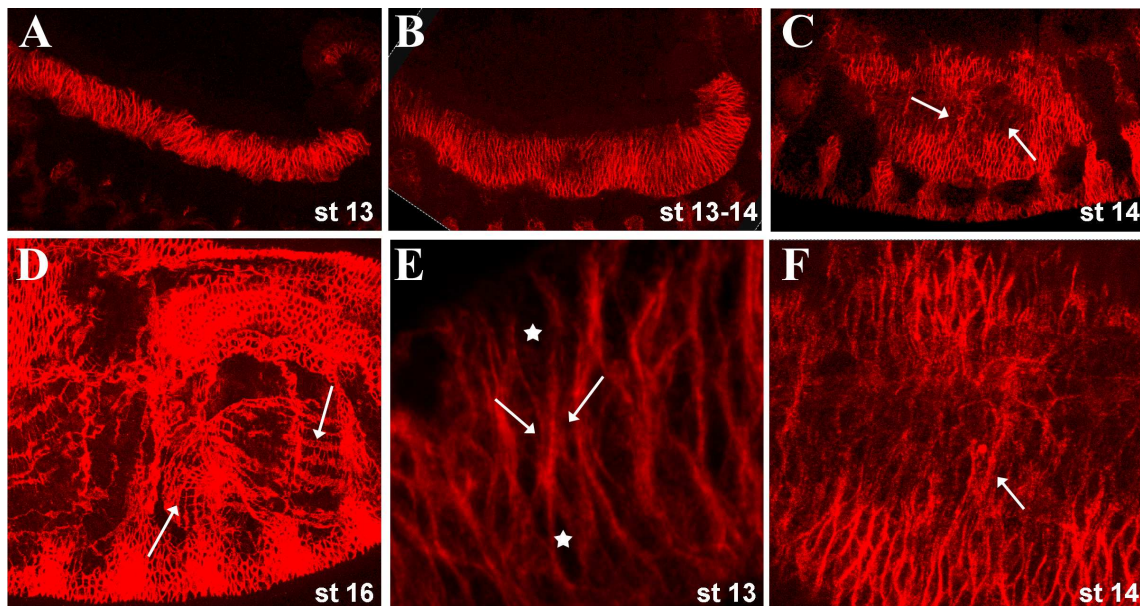


Abbildung 13.5.: Bildung der Netzstruktur der zirkulären Mitteldarm-Muskeln von *Drosophila melanogaster* im Lichtmikroskop: A-F Fluoreszenz-Immunhistologischer Nachweis von FasIII. A, E Stadium 13. B Stadium 13-14. C, F Stadium 14. D Stadium 16. A, B Die fusionierten Syncytien strecken sich entlang des sich schließenden Darmrohres. C Pfeile: Strings, die die nicht benötigten fusionskompetenten Myoblasten überlagern werden bei weiterer Streckung sichtbar. D Das Netzwerk aus zirkulären und longitudinalen Muskeln ist fertig, Pfeile: Stellen an denen sich die netzförmigen zirkulären Muskeln mit den massiven longitudinalen Muskeln kreuzen. E Höhere Vergrößerung von A. Zwischen den beiden Reihen, die die Zellkörper enthalten (Sterne) werden die Strings als fädige Verbindungen sichtbar (Pfeile). F Höhere Vergrößerung von C.

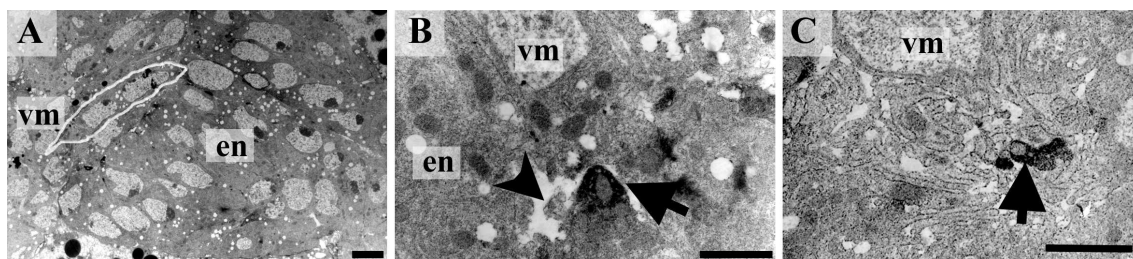


Abbildung 13.6.: Bildung der Netzstruktur der Ringmuskeln im TEM: A-C Transmissions-Elektronen-Mikroskopie an Embryonen der Stadien 12 bis 13. A Stadium 12, die fusionierten, zweikernigen Syncytien (weiss umrandet) strecken sich um das Endoderm, Balken = 1 μm . B Spätes Stadium 12, zwischen den sich auseinander streckenden Teilen des Syncytiums sind Anschnitte (Pfeilkopf) der sich bildenden fädigen Netzstruktur sichtbar, Pfeil: elektronendichtes Membranreservoir, Balken = 2 μm . C Stadium 13, der die fädigen Netzstrukturen enthaltende Bereich dehnt sich aus, mehr Anschnitte sind sichtbar, Pfeil: elektronendichtes Membranreservoir, Balken = 1,5 μm . en = Endoderm, vm = viszerale Mesoderm.

nen sie als rundliche Anschnitte (Abb. 13.6, B, Pfeilkopf, C). Auffällig ist dabei eine elektronendichte Struktur in der Mitte des sich bildenden Netzwerkes (Abb. 13.6, B, C, Pfeil), die als Membrandepot, wie es z.B. bei der Rhabdomer-Entwicklung vorkommt, für die sich bildenden Verbindungsschläuche interpretiert werden kann.

14. Expressionsmuster von Blown fuse und Kette

14.1. Blow ist in allen Myoblasten des lateralen viszeralen Mesoderms exprimiert, im somatischen Mesoderm jedoch auf die fusionskompetenten Myoblasten beschränkt

Das Expressionsmuster von Blown fuse während der Embryonalentwicklung wurde mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper-Nachweisen analysiert. Dabei zeigte sich, dass im viszeralen Mesoderm sowohl die zirkulären Founder-Zellen als auch die fusionskompetenten Myoblasten Blow exprimieren (Abb. 14.1, A, D), während die Expression im somatischen Mesoderm auf die fusionskompetenten Myoblasten beschränkt ist (Abb. 14.1, B, G). Hinzu kommt eine deutliche Expression in den Muskelenden während der späten Embryonalstadien, in denen der Kontakt zwischen dem fertigen Muskel und seiner Anheftungsstelle gebildet wird (Abb. 14.1, C). Zudem wird in älteren Embryonen eine schwächere Expression im Bereich des zentralen und peripheren Nervensystems beobachtet, der im Kontext dieser Arbeit jedoch nicht weiter nachgegangen werden soll (ohne Abbildung).

Die Beobachtung, dass sich die Expression von Blown fuse während der fusionsrelevanten Stadien 11 bis 14 im somatischen und viszeralen Mesoderm auf unterschiedliche Myoblastenpopulationen erstreckt, wurde durch das Vergleichen des Blown fuse-Expressionsmusters mit den bekannten Expressionsmustern der Anaplastischen-Lymphom-Kinase (Alk) und von Ultrabithorax (Ubx) verifiziert. Alk ist im viszeralen Mesoderm sowohl in den zirkulären Founder-Zellen als auch in den fusionskompetenten Myoblasten exprimiert (Loren et al., 2003) (Abb. 14.1, E). Im direkten Vergleich einer Doppelfärbung zeigt Blown fuse das identische Expressionsmuster (Abb. 14.1, D anti-Blow, F Overlay anti-Alk und anti-Blow), wodurch die Expression in beiden Myoblastenpopulationen des viszeralen Mesoderms bestätigt wird. Im Gegensatz dazu zeigt die Expression von Ubx, die spezifisch in einem Subset von somatischen Founder-Zellen erkennbar ist (Abb. 14.1, H), keine Überlappung mit dem Blown fuse-Muster (Abb. 14.1, G anti-Blow, I Overlay anti-Ubx (Pfeil) und anti-Blow).

In *notch*-mutanten Embryonen läßt sich die beschriebene Beobachtung zusätzlich

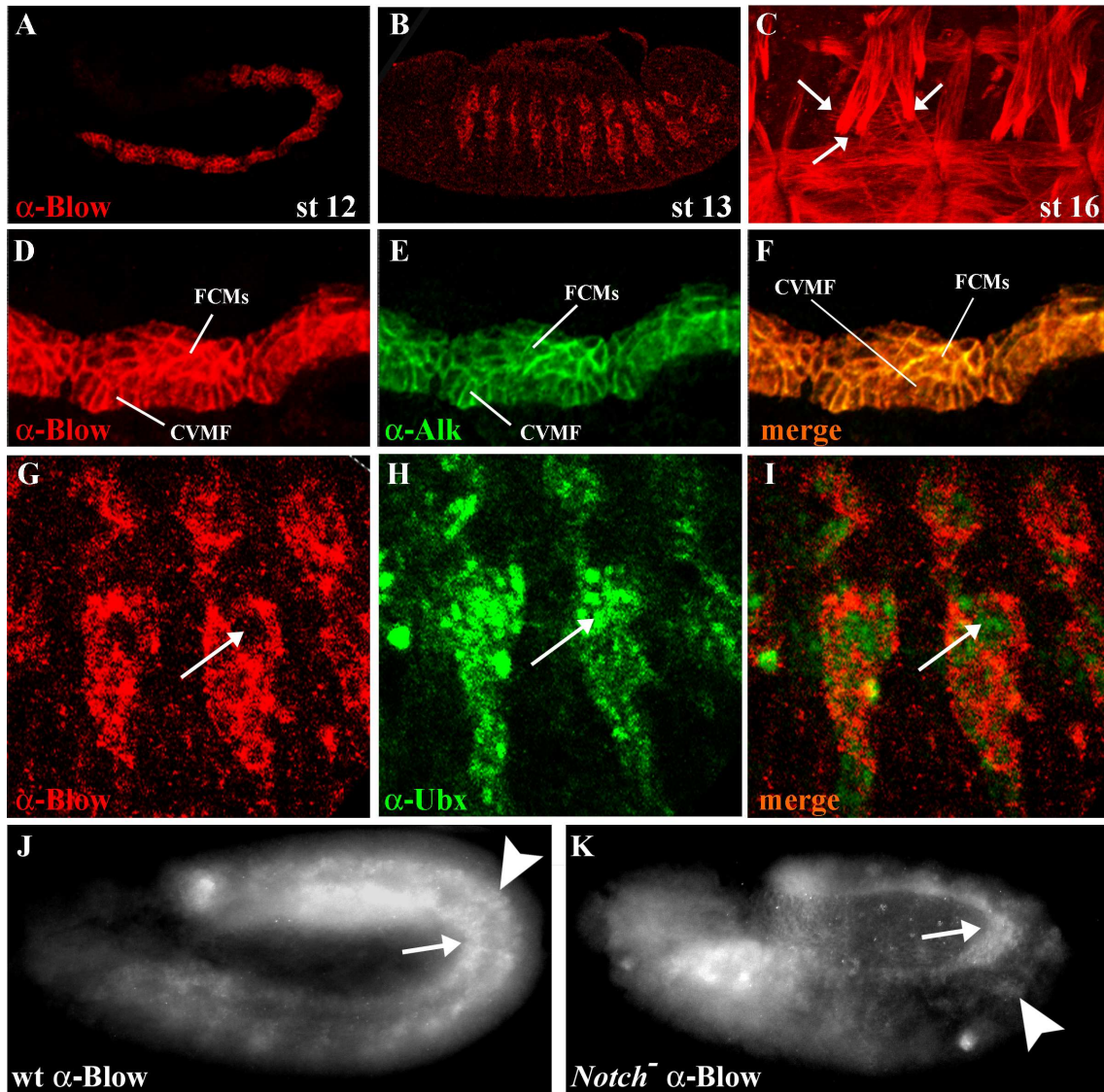


Abbildung 14.1.: Expressionsmuster von Blown fuse: A-J Wildtyp. K *Notch*-Mutante. A-D, G, J, K *Blown fuse*. E *Alk*. H *Ubx*. F *Blown fuse*, *Alk*, Overlay. I *Blown fuse*, *Ubx*, Overlay. A, D Stadium 11, *Blown fuse* ist in den zirkulären Founder-Zellen und viszerale fusionskompetenten Myoblasten exprimiert, B, G Stadium 13, *Blown fuse* ist in den fusionskompetenten Myoblasten des somatischen Mesoderms exprimiert, C Expression von *Blown fuse* in den Muskelenden während der Muskelanheftung im Stadium 16. E Expressionsmuster von *Alk* im Stadium 11, F *Alk* und *Blown fuse* sind in den gleichen Zellen exprimiert. H *Ubx* ist einem Subset von somatischen Founder-Zellen exprimiert. I *Blown fuse* und *Ubx* zeigen kein überlappendes Expressionsmuster im somatischen Mesoderm. J Im Wildtyp exprimieren sowohl das viszerale (Pfeil) als auch das somatische (Pfeilkopf) Mesoderm *Blown fuse*. K Die Zahl *Blown fuse*-positiver Zellen im somatischen Mesoderm (Pfeilkopf) der *Notch*-Mutante ist deutlich reduziert.

bestätigen. Hier ist die Zahl der fusionskompetenten Myoblasten im somatischen Mesoderm dramatisch reduziert (Carmena et al., 1998 und 2002), so dass bei einer Beschränkung der *Blown fuse*-Expression auf die fusionskompetenten Myoblasten eben-

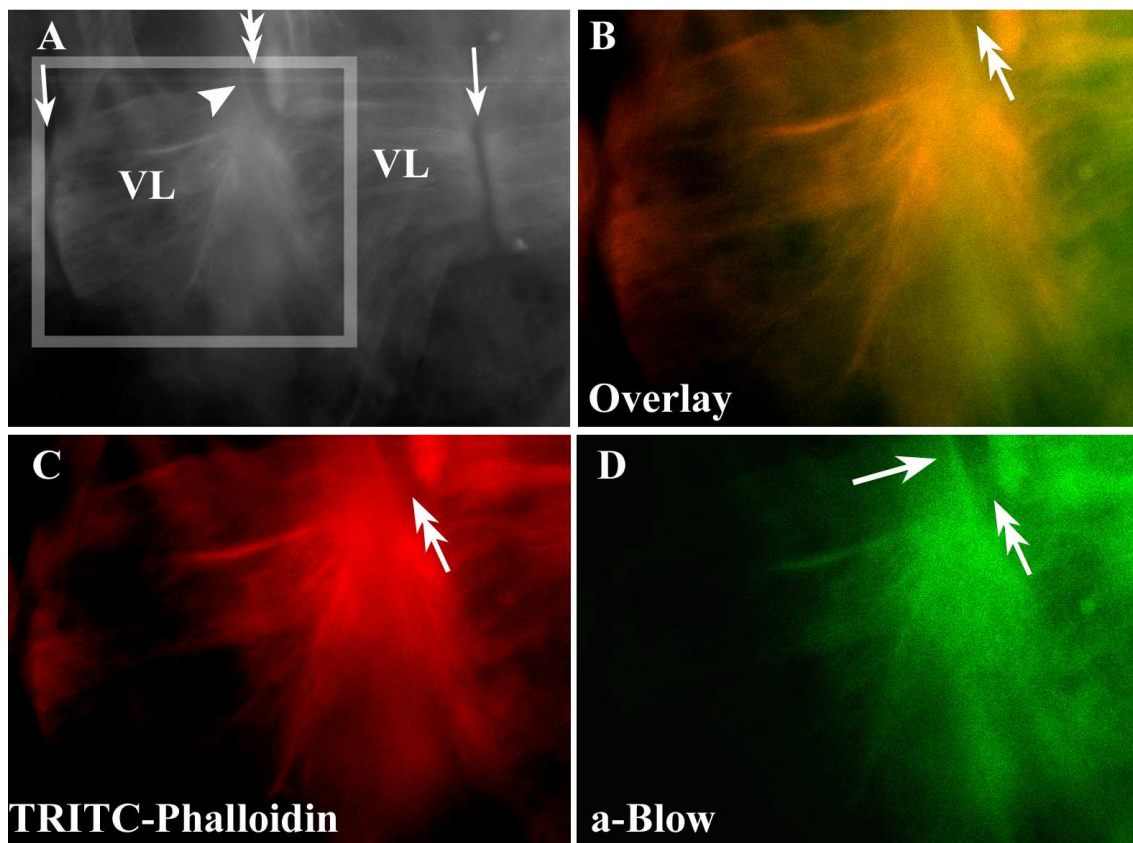


Abbildung 14.2.: Blown fuse kolokalisiert mit filamentärem Aktin: A-D Stadium 16, Wildtyp. A, C Nachweis von filamentärem Aktin durch TRITC-Phalloidin, A Übersicht des in B-D gezeigten Embryos, geringere Vergrößerung von B-D, VL = ventrale Muskelgruppe, der das Segment lateral durchspannt, Pfeile weisen auf Verankerungsregion in der Epidermis, Pfeilkopf weist auf sich bildende terminale Z-Scheibe. Der Doppelpfeil weist auf ebenfalls in B-D mit Doppelpfeil markierte Verankerungsregion. B Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter immunhistologischer Nachweis von Blown fuse, D Overlay, beide Nachweise zeigen deutlich das identische Muster.

falls eine deutliche Reduktion der Blow-positiven Zellen im somatischen Mesoderm der mutanten Embryonen zu erwarten ist. Dies ist klar der Fall (Abb. 14.1): Während im Wildtyp sowohl das viszerale Band (Abb. 14.1, J, Pfeil), als auch das somatische Band (Abb. 14.1, J, Pfeilkopf) der fusionskompetenten Myoblasten Blow exprimieren, ist in der Mutante nur die Expression im viszeralen Band (Abb. 14.1, K, Pfeil), begleitet von einzelnen Blown fuse positiven somatischen Zellen (Abb. 14.1, K, Pfeilkopf) sichtbar .

Eine detailliertere Analyse der Blown fuse-Lokalisation im Mesoderm später Embryonalstadien zeigt, dass Blown fuse mit filamentärem Aktin kolokalisiert, das hier mit Hilfe von TRITC-Phalloidin dargestellt ist (Abb. 14.2 A, B, C). Dabei ist wie bereits oben beschrieben eine Anreicherung im Bereich der sich anheftenden Muske-

lenden (Abb. 14.2 A Pfeile) bei den sich bildenden terminalen Z-Scheiben (Abb. 14.2, D Pfeil, A Pfeilkopf) zu erkennen.

14.2. Enhancer-Elemente für die Transkription von *blow* im viszeralen und somatischen Mesoderm sind im ersten Intron des Gens zu finden

Das oben beschriebene differentielle Expressionsmuster von *Blown fuse* wird durch die Verwendung spezifischer Enhancer-Elemente reflektiert. Während die Transkription von *blown fuse* im PNS durch Elemente des zweiten Introns gesteuert wird (Schröter Diplomarbeit, 2003), erfolgt die Steuerung der mesodermalen Transkription durch Enhancer, die im ersten Intron des Gens zu finden sind. Dabei kann mit Hilfe eines *lacZ*-Reportergen-Konstruktes, das als Steuerungselement den Bereich -5 bis +1652 des Gens enthält, das mesodermale Expressionsmuster komplett dargestellt werden. Dazu wurden der genannte Bereich zunächst mit Hilfe der Primer Peregrin und Tuck per PCR an genomischer DNA von *white*⁻-Fliegen amplifiziert und in pCR-TOPO-II zwischenklontiert. Anschließend wurde das Insert durch Restriktion mit den Enzymen Not I und BamH I aus pCR-TOPO-II ausgeschnitten und gerichtet in den entsprechend vorbehandelten Vektor pCasperHSP43 kloniert, der downstream der MCS über den basalen Promotor HSP40 und das *lacZ*-Gen verfügt. Nach der Etablierung stabil transgener Fliegen wurden 6 unabhängige Linien erhalten, die das folgende β -Galactosidase-Muster zeigen: Während des Stadiums 11 findet eine Expression sowohl im viszeralen Mesoderm (Abb. 14.3, B, vm) als auch im somatischen Mesoderm (Abb. 14.3, B, sm) und im Pharynx (Abb. 14.3, B, ph) statt. Ab dem Stadium 12 ist dann im somatischen Mesoderm zu erkennen, dass die Expression, analog zum oben festgestellten *Blown fuse*-Muster, auf die fusionskompetenten Myoblasten beschränkt ist (Abb. 14.3, C, E). Dies wurde zusätzlich in Doppelmarkierungen mit Hilfe von des Ubx-Antikörpers getestet (Daten nicht gezeigt). Ausserdem ist eine Expression in den fusionierten zirkulären viszeralen Mitteldarmmuskeln feststellbar (Abb. 14.3, D, Pfeil), sowie eine Expression in den longitudinalen Founder-Zellen (Abb. 14.3, D, Pfeilköpfe). Da jedoch über den Vektor pCasperHSP43 bekannt ist, dass er eine eigenständige Expression in den longitudinalen Founder-Zellen verursachen kann (Kesper, mündliche Mitteilung), ist nicht klar zu beurteilen, ob die hier beobachtete Expression in den Founder-Zellen der

viszerale longitudinalen Muskeln einem echten Enhancer-Element zugeschrieben werden kann.

14.2.1. Ein spezieller Enhancer zur Steuerung der *blown fuse*-Transkription im viszerale Mesoderm liegt im ersten Intron im Bereich der Basenpaare +509 bis +1072

Mit Hilfe der Primer Tom und Bombadil wurde ein 562 bp großes Fragment, das die Basen +509 bis +1072 umfasst, an genomischer DNA von *white*⁻-Fliegen amplifiziert und zunächst in pCR-TOPOII zwischenkloniert. Von dort wurde es mit Hilfe der Restriktionsenzyme KpnI und XhoI gerichtet in den Vektor pCasperHSP43 kloniert. Durch P-Element-Transformation wurde das so gewonnene *lacZ*-Reporter-Konstrukt stabil in die Keimbahn von *white*⁻-Fliegen integriert. Der Nachweis aktiver β -Galactosidase reflektiert in den Stadien 11 bis 14 das mit Hilfe der immunhistologischen Analyse bestimmte Expressionsmuster von *Blown fuse* im viszerale Mesoderm (Abb. 14.3, F). Ausserdem erfolgt eine späte Transkription ab dem Stadium 15 in den syncytialen Muskeln des somatischen Mesoderms, die besonders intensiv im Bereich der sich an die Epidermis anheftenden Muskelenden ist (Abb. 14.3, G, Pfeile). Letzteres kann als Spiegelung der späten Expression von *Blown fuse* in den Muskelenden interpretiert werden, es bleibt jedoch zu klären, ob es sich um zwei verschiedene im untersuchten Fragment enthaltene Enhancer handelt, oder ob beide Transkriptionsereignisse vom gleichen Enhancer gesteuert werden.

14.2.2. Suche nach Bindestellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb der gefundenen Enhancerelemente

Die Suche nach spezifischen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wurde mit Hilfe des Computerprogramms MatchTM durchgeführt. Dabei wurden neben anderen vor allem die beiden Transkriptionsfaktoren Grainyhead und Paired ins Zentrum des Interesses gerückt (Abb. 14.3, A).

Um eine mögliche Beteiligung dieser Faktoren an der Transkription von *blown fuse* zu überprüfen, wurde zunächst festgestellt, ob sie überhaupt für die Entwicklung der Muskeln notwendig sind. Dazu wurde mit Hilfe des β -3-Tubulin-Antikörpers die morphologische Ausbildung der somatischen Muskeln in mutanten Embryonen analysiert. In *grainyhead*-Mutanten werden offensichtlich Muskeln durch Fusion gebildet und regelmäßig angeordnet, jedoch sind gelegentlich Probleme bei der Verankerung

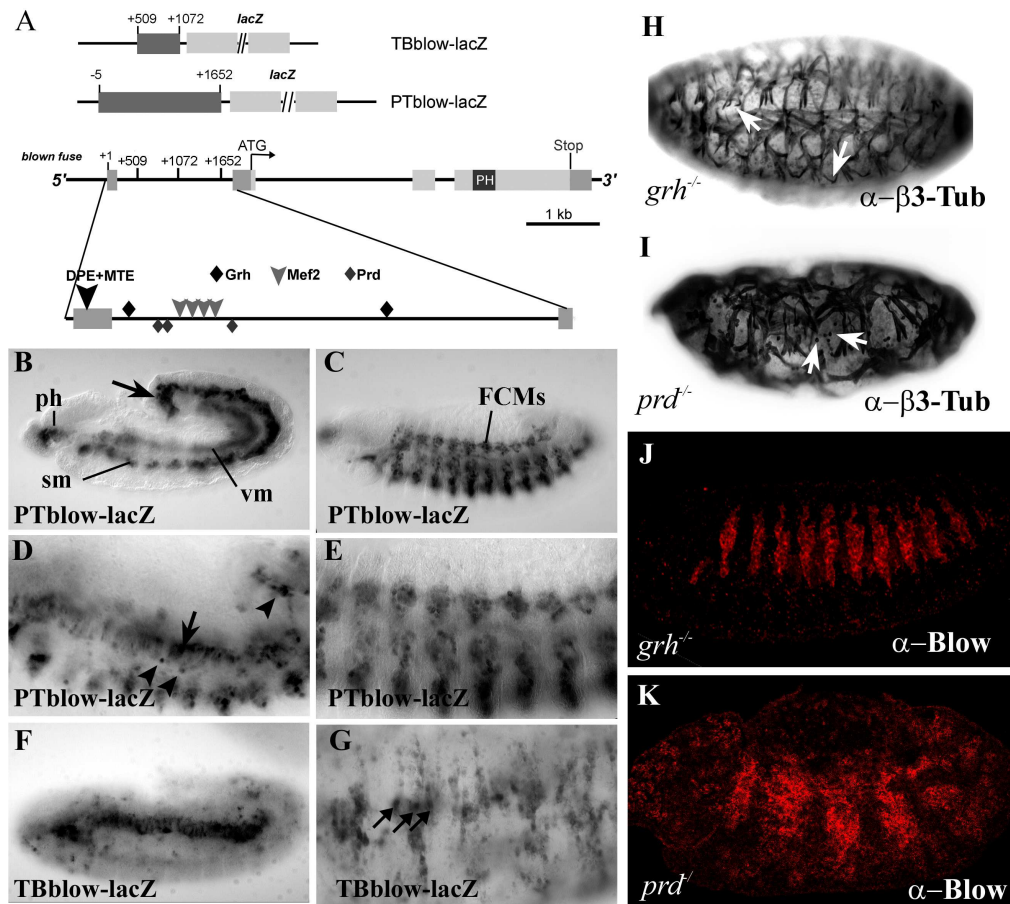


Abbildung 14.3.: Die mesodermale Transkription von Blown fuse wird durch Elemente im ersten Intron gesteuert: **A** Schematische Darstellung des untersuchten Bereichs des Gens *blown fuse* sowie der Reporterkonstrukte TBblow-lacZ und PTblow-lacZ, hellgrau = Protein-codierend, mittelgrau = codierend für 3'- bzw. 5'-UTR, dunkelgrau = getesteter Bereich des ersten Introns. In der Vergrößerung des ersten Introns sind putative Bindestellen für bekannte Transkriptionsfaktoren eingezeichnet. **B-G** Immunhistologischer Nachweis von β -Galactosidase an transgenen Embryonen. **B-E** stabil transgene Embryonen, die das Reportergenkonstrukt PTblow-lacZ exprimieren. **F-G** stabil transgene Embryonen, die das Reportergenkonstrukt TBblow-lacZ exprimieren. **B** Stadium 11, PTblow-lacZ Expression im viszeralen und somatischen Mesoderm, Pfeil = longitudinale viszerale Founder. **C** Stadium 13, PTblow-lacZ Expression in den fusions-kompetenten Myoblasten des somatischen Mesoderms. **D** Stadium 12 bis 13, PTblow-lacZ Expression im viszeralen Mesoderm, Pfeilkopf = longitudinale Founder, Pfeil = zirkuläre Muskeln. **E** Stadium 12 bis 13, PTblow-lacZ Expression im viszeralen Mesoderm. **F** Stadium 12 bis 13, TBblow-lacZ ist nicht im somatischen Mesoderm exprimiert, TBblow-lacZ Expression im viszeralen Mesoderm. **G** Stadium 16, TBblow-lacZ Expression im Bereich der Muskelenden sich anheftender Muskeln. **H** Stadium 16, *grh*-mutanter Embryo, immunhistologischer β 3-Tubulin-Nachweis, kein Fusionsdefekt, selten: fehlgeleitete Muskeln (Pfeil). **I** Stadium 14 oder älter, *prd*-mutanter Embryo, immunhistologischer β 3-Tubulin-Nachweis, starke Defekte bei der Bildung der Muskulatur begleitet von unfusionierten Myoblasten (Pfeil). **J** Stadium 13-14, *grh*-mutanter Embryo, Blow-Expression im somatischen Mesoderm. **K** Stadium 13, *prd*-mutanter Embryo, Blow-Expression im somatischen Mesoderm.

der Muskeln in der Epidermis zu beobachten (Abb. 14.3, H, Pfeile = fehlgeleitete Muskelenden). Im Gegensatz dazu erscheint das Mesoderm von *paired*-Mutanten schon früh in der Entwicklung stark gestört, wodurch eine eindeutige Zuweisung von Entwicklungsstadien nicht möglich ist. Es weist neben anderen drastischen Defekten in Embryonen, die mindestens dem Stadium 13 entsprechen, eine Unordnung der somatischen Muskeln, begleitet von einer gewissen Anzahl unfusionierter Myoblasten auf (Abb. 14.3, I, Pfeile = unfusionierte Myoblasten).

Als nächstes wurde mit Hilfe von Immunhistologie in den für die entsprechenden Transkriptionsfaktoren Mutanten Embryonen überprüft, ob das *Blown fuse*-Protein exprimiert wird. Dabei konnte sowohl in *grh*- (Abb. 14.3, J) als auch in *prd*-Mutanten (Abb. 14.3, K) eindeutig eine Expression von *Blown fuse* in den fusionsrelevanten Stadien beobachtet werden. Da unter anderem auch Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Mef2 gefunden wurden (Abb. 14.3, A) und eine Beteiligung dieses Faktors an der Myogenese von *Drosophila* bereits bekannt ist (Taylor, 1998), wurde auch in Mef2-Mutanten Embryonen die Expression von *Blown fuse* überprüft. Auch hier ist das Protein eindeutig nachweisbar, jedoch erscheint das Expressionsniveau gegenüber Wildtyp-Embryonen gelegentlich leicht abgeschwächt, was darauf hindeutet, dass Mef2 gemeinsam mit anderen Faktoren an der Transkription von *blown fuse* beteiligt sein könnte. Eine Essentialität von Mef2 als alleiniger Faktor für die Expression von *Blown fuse* wird aufgrund des vorhandenen *Blow*-Proteins jedoch ausgeschlossen.

14.3. Kette ist während der Myogenese-relevanten Entwicklungsstadien ubiquitär im Embryo verteilt

Da für Kette bisher lediglich eine Beteiligung an der Neurogenese bekannt war (vgl. Einleitung) wurde überprüft, ob das Protein im Mesoderm exprimiert wird. Sollte dies nicht der Fall sein, könnte eine intrinsische Funktion ausgeschlossen werden und die beobachteten Myogenese-Defekte wären als Sekundäreffekte einzustufen. Die Analyse des Kette-Expressionsmusters erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Immunhistologie. Während der Stadien 10 bis 13 wurde eine ubiquitäre zytoplasmatische Verteilung im Embryo beobachtet. Besonders fällt dabei auf, dass Kette ab Stadium 13, während dem der größte Teil der somatischen Fusionen stattfindet, deutlich im Zytosol der fusionskompetenten Myoblasten und

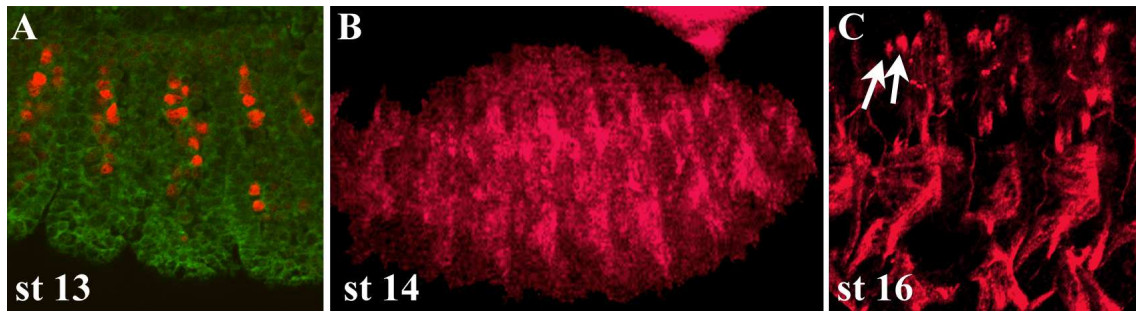


Abbildung 14.4.: Expressionsmuster von Kette: **A** Wildtyp-Embryo, Stadium 13, grün: immunhistologischer Nachweis des Kette-Proteins mit Hilfe des Kette-Antikörpers, rot: immunhistologische Markierung der rP298-lacZ exprimierenden somatischen Founder-Zellen mit Hilfe des β -Galactosidase-Antikörpers. **B**, **C** immunhistologischer Nachweis des Kette-Proteins. **B** Stadium 14, **C** Stadium 16, Pfeile = Akkumulation des Proteins in den Muskelenden.

in dem der mit Hilfe der Enhancer-Trap-Linie rP298-*lacZ* markierten Kerne der Founder-Zellen (Abb. 14.4, A) exprimiert ist. Ab dem Stadium 14 kommt es zu einer weiteren Verstärkung der Expression im somatischen Mesoderm, die sich von der ubiquitären Expression im restlichen Embryo deutlich abhebt (Abb. 14.4, B). In Embryonen der Stadien 16 und 17 konnte neben dem bereits bekannten Expressionsmuster im Zentralen Nervensystem (Hummel et al. 2000) eine Anreicherung des Kette-Proteins in den Muskelenden der somatischen Muskeln beobachtet werden (Abb. 14.4, C, Pfeile), die an das oben beschriebene späte Expressionsmuster von *Blown fuse* erinnert.

15. Charakterisierung des viszeralen Phänotyps von *blow*- und *kette*-mutanten Embryonen

Bei der Analyse des Phänotyps von *blow*- bzw. *kette*-mutanten Embryonen fallen neben den Defekten bei der Bildung der somatischen Muskulatur Störungen bei der Bildung des Darmes auf. Während in beiden Mutanten austretender Dotter auf ein nichtgeschlossenes oder instabiles Darmrohr hinweist, ist neben der Fehlordnung der Darmkonstriktionen (Abb. 15.1, B) auch eine stark chaotische Fehlordnung der viszeralen Mitteldarmmuskeln (Abb. 15.1, C) festzustellen. Da ein instabiles Darmrohr, das zu austretendem Dotter führt, sowohl durch endodermale Defekte bei der Bildung des Mitteldarmes, als auch durch das Fehlen der viszeralen Muskeln bedingt sein kann, wurde zunächst festgestellt, ob das Darmrohr überhaupt gebildet wird. Dazu wurden Querschnitte von *blow*- und *kette*-mutanten Embryonen untersucht. In allen konnte eindeutig festgestellt werden, dass das Endoderm vorhanden und das Darmrohr korrekt geschlossen ist (vgl. Abb. 15.2, B). Es liegt also nahe, dass der Defekt durch das prinzipielle Fehlen der Muskeln oder eine während der Myogenese auftretende Störung entsteht.

15.1. Die viszeralen Founder-Zellen und die fusionskompetenten Myoblasten sind in beiden Mutanten vorhanden

Zunächst wurde ausgeschlossen, dass in *blow*- bzw. *kette*-mutanten Embryonen ein Defekt bei der Bildung der viszeralen Muskulatur im Fehlen einer der beteiligten Myoblasten-Populationen begründet ist.

15.1.1. Die Founder der zirkulären Muskeln sind vorhanden

Um nachzuweisen, dass die Founder der Ringmuskeln in *blow* und in *kette*-mutanten Embryonen vorhanden sind, wurde die Enhancertrap-P-Element-Insertionslinie rP298-*lacZ* benutzt. Diese exprimiert analog zum Expressionsmuster von Dumbfounded spezifisch in Muskel-Founder-Zellen das *E.coli*-Enzym β -Galactosidase, das in diesem Fall durch Immunhistologie nachgewiesen und aufgrund einer artifiziellen NLS in den Kern transportiert wird. Dabei ist in allen Fällen deutlich zu erkennen, dass

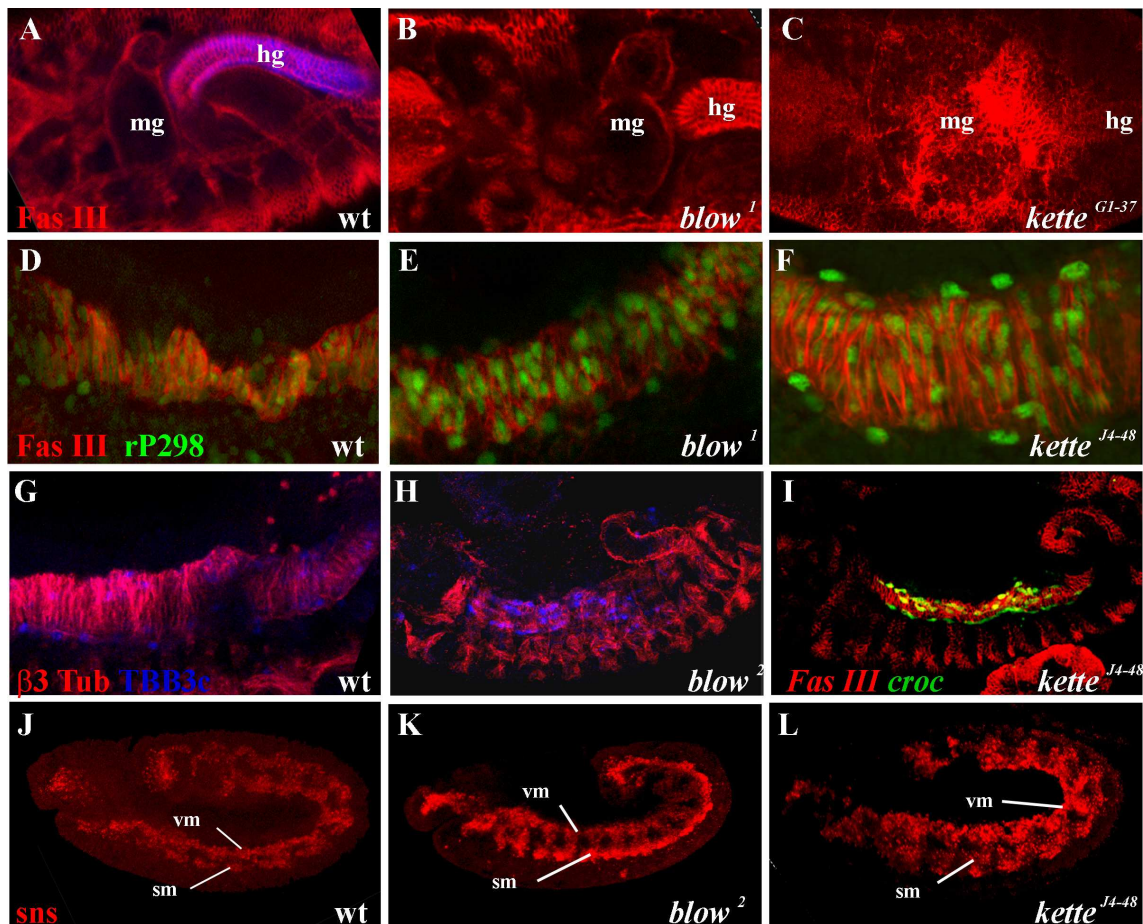


Abbildung 15.1: *blow*- und *kette*-mutante Embryone haben Defekte bei der Bildung des Darmes, die viszerale Founder-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten sind vorhanden: A, D, G, J Wildtyp. B, E, H, K *blow*-mutante Embryonen, B und E = *blow*¹, H und K = *blow*². C, F, I, L *kette*^{J4-48}-mutante Embryonen. A-I rot: α-FasIII. D, E, F grün: α-β-Galactosidase, rP298-lacZ. G, H blau: α-β-Galactosidase, TBB3c-lacZ. I grün: α-β-Galactosidase, *croc*-lacZ. J-L *in-situ*-Hybridisierung mit *sns*-antisense-RNA-Sonde. hg = Enddarm, mg = Mitteldarm, sm = somatisches Mesoderm, vm = viszerale Mesoderm.

β-Galactosidase-positive Kerne innerhalb des durch FasIII markierten Bandes sich entwickeln der zirkulärer Muskeln vorliegen (Abb. 15.1, D, E, F).

15.1.2. Die Founder der longitudinalen Muskeln sind vorhanden und wandern entlang der zirkulären Muskeln ein

Um die longitudinalen Founder in *kette*-Mutanten bzw. in Wildtyp-Embryonen zu markieren wurde die Enhancertrap-Linie *croc*-lacZ verwendet (Abb. 15.1, G = Wildtyp, H = *kette*-mutanter Embryo). Die Markierung der longitudinalen Founder in *blow*-mutanten Embryonen erfolgte mit Hilfe der Enhancertrap-Linie TBP-lacZ

(Abb. 15.1, I), die als Nebenprodukt bei der Analyse der Transkriptionskontrolle von *blown fuse* erhalten wurde. Der Galactosidase-Nachweis erfolgte jeweils durch Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelte Immunhistologie. Sowohl in *blow*- als auch in *kette*-mutanten Embryonen konnte festgestellt werden, dass die longitudinalen Founder-Zellen zunächst als Pool im caudalen viszeralem Mesoderm vorliegen und später entlang des sich bildenden Darmes einwandern (Abb. 15.1, H, I). Dabei erscheint jedoch der Bereich, in dem die Einwanderung erfolgt, im Wildtyp wesentlich weiter in dorso-ventraler Richtung ausgedehnt zu sein, als in *blow*- und *kette*-mutanten Embryonen.

15.1.3. Die fusionskompetenten Myoblasten exprimieren in beiden Mutanten

sns

Mit Hilfe einer RNA-anti-sense-*sns* Sonde wurde durch *in-situ*-Hybridisierung sowohl an *blow* als auch an *kette*-mutanten Embryonen überprüft, ob die fusionskompetenten Myoblasten des viszeralem und somatischen Mesoderms vorhanden sind. Da *sns* spezifisch in dieser Zellpopulation transkribiert wird, sollte ein Fehlen oder eine falsche bzw. fehlende Determination der fusionskompetenten Myoblasten dazu führen, dass keine *sns*-mRNA detektiert werden kann. Es konnte für beide Mutanten festgestellt werden, dass *sns* sowohl im viszeralem (Abb. 15.1, K, L, vm, vgl. Wildtyp in J) als auch im somatischen Mesoderm (Abb. 15.1, K, L, sm, vgl. Wildtyp in J) exprimiert wird, so dass darauf geschlossen werden kann, dass die fusionskompetenten Myoblasten in beiden Geweben vorhanden und determiniert sind.

15.2. Die zirkulären Founder-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten *blow*- bzw. *kette*-mutanter Embryonen fusionieren miteinander

Transmission-Elektronen-Mikroskopie an *blow*- und *kette*-mutanten Embryonen zeigte schließlich, dass die Founder der Ringmuskeln mit den fusionskompetenten Myoblasten analog zum Wildtyp fusionieren. Es wurden insgesamt 27 *blow*-mutante Embryonen und 32 *kette*-mutante Embryonen analysiert. Dabei wurden Embryonen der Stadien 10 bis 17 untersucht. Insgesamt ist festzustellen, dass es sowohl in *blow*-mutanten Embryonen als auch in (Abb. 15.2, A, B) *kette*-mutanten Embryonen (Abb. 15.2 C) eindeutig zur Fusion der zirkulären Founder-Zellen mit viszeralem

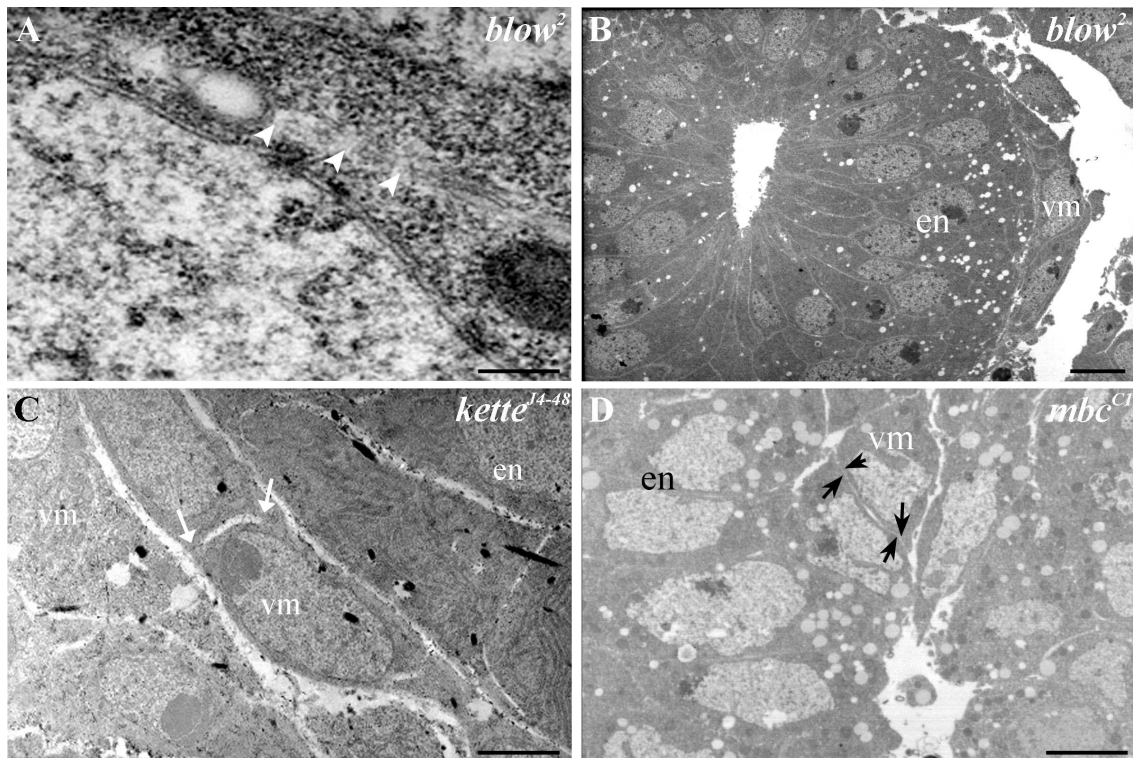


Abbildung 15.2.: Die Fusion zu den zirkulären Mitteldarm-Muskeln in *blow*- und *kette*-mutanten Embryonen findet statt: A- D Transmissionselektronenmikroskopie an Querschnitten. **A**, *blow*²-mutanter Embryo, Stadium 13, Membranzusammenbruch Pfeile weisen auf Bereiche, die frei von elektronendichtem Material sind, Balken = 150 nm. **B**, *blow*²-mutanter Embryo, spätes Stadium 14, das fusionierte Syncytium viszeraler Zellen (vm) ist lateral des geschlossenen Darmrohres positioniert, Balken = 2 μ m. **C**, *kette*^{J4-48}-mutanter Embryo, Stadium 15, fusionierte Zellen des viszeralen Mesoderms, Pfeile weisen auf cytoplasmatische Brücken, Balken = 1 μ m. **D** *mbc*^{C1}-mutanter Embryo, Stadium 12, Paar aus Founder-Zelle und fusionkompetentem Myoblasten im viszeralen Mesoderm (vm) mit Bereichen dichter Kontaktstrukturen (Pfeile). Es findet jedoch keine Fusion statt, Balken = 400 nm, en = Endoderm.

fusionskompetenten Myoblasten kommt. Dabei ist in beiden Fällen zu beobachten, dass der Membranzusammenbruch vom späten Stadium 12 bis zum Stadium 13, also deutlich später als in Wildtyp-Embryonen (siehe 13.2, Seite 88), stattfindet (Abb. 15.2, A *blow*-mutanter Embryo, Pfeilköpfe weisen auf Bereiche, die frei von elektronendichtem Material sind und in denen die Fusion stattgefunden hat). Die entsprechenden Zellen ordnen sich analog zum Wildtyp lateral des geschlossenen Darmrohres an (Abb. 15.2, B *blow*-mutanter Embryo, vm markiert ein lateral des Darmrohres positioniertes Syncytium), es kommt jedoch nicht zur Bildung der für die zirkulären Muskeln typischen Netzstruktur, sondern die Muskeln verbleiben auf dem Entwicklungsstand der wildtypischen Ringmuskel-Syncytien des Stadium 12 (Abb.

15.2, C, Pfeile deuten auf cytoplasmatische Brücken, die auch hier die stattgefundene Fusion dokumentieren). Zum späteren Vergleich mit der somatischen Fusion wurden hier zusätzlich *mbc*-mutante Embryonen herangezogen. Auch hier sind Paare von zirkulären Founder-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten zu beobachten, die stellenweise in engem Kontakt miteinander stehen (Abb. 15.2, D, vm). Jedoch wird dieser Kontakt meistens wieder gelöst und es kommt zur kompletten Dissoziation des Zellpaares. Nur in Ausnahmefällen konnte eine Fusion beobachtet werden. Dies korreliert mit bereits früher von Klapper et al. (2001) publizierten Daten. Daraus wird geschlossen, dass Kette und Blown fuse im Gegensatz zu Mbc für die Fusion der zirkulären Founder-Zellen mit den viszeralen fusionskompetenten Myoblasten nicht essentiell sind.

15.3. *blow*- und *kette*-mutante Embryonen weisen Störungen bei der Streckung der zirkulären viszeralen Muskeln um den Darm auf

Ausgehend von der im TEM beobachteten lateralen Positionierung der fusionierten Syncytien in *kette*- und *blow*-mutanten Embryonen zeigt eine genauere immunhistologische Analyse der Ringmuskel-Morphologie mit Hilfe des Markers Fasciclin-III, dass die Ringmuskeln weder in *kette*- noch in *blow*-mutanten Embryonen in der Lage sind, sich um das sich schließende Darmrohr zu strecken (Abb. 15.3, vergleiche Ausdehnung der zirkulären Muskeln im Wildtyp (A) mit der in (B) *blow*- bzw. (C) *kette*-mutanten Embryonen gleichen Stadiums). Darüberhinaus sind von Zeit zu

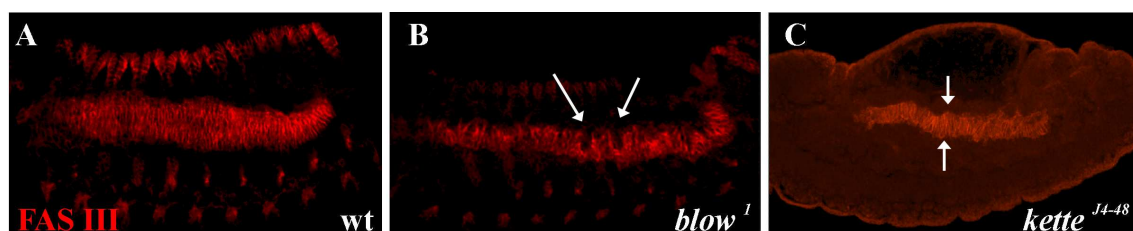


Abbildung 15.3.: *blow*- und *kette*-mutante Embryonen zeigen Störungen bei der Streckung der zirkulären Muskeln um den Darm: A-C, Fluoreszenzfarbstoffgekoppelter immunhistologischer Nachweis von FasciclinIII an Stadium 13 Embryonen. **A** Wildtyp mit sich streckenden fusionierten zirkulären Muskeln. **B** *blow*¹-mutanter Embryo mit Lücken im Band der zirkulären Muskeln (Pfeile) und im Vergleich zum Wildtyp geringerer dorso-ventraler Ausdehnung der zirkulären Muskeln. **C** *kette*^{J4-48}-mutanter Embryo mit deutlich gerinerer dorso-lateraler Ausdehnung der zirkulären Muskeln als im Wildtyp (Pfeile).

Zeit in *blow*-mutanten Embryonen Lücken im anterior-posterioren Band der Ringmuskeln zu beobachten (Abb. 15.3, B, Pfeile). Der beobachtete austretende Dotter kann also vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass das sich zwar schließenden Darmrohr durch die dorsal und ventral fehlenden Ringmuskeln nicht die notwendige Stabilität erreicht, um den Dotter in seinem Inneren zurückzuhalten. Da die Ringmuskeln im Wildtyp als Migrationssubstrat für die sich bildenden Längsmuskeln dienen, erklärt sich auf diese Weise auch die verringerte dorso-ventrale Ausbreitung der einwandernden longitudinalen Founder-Zellen.

16. Charakterisierung des somatischen Phänotyps von *blow*- und *kette*-mutanten Embryonen

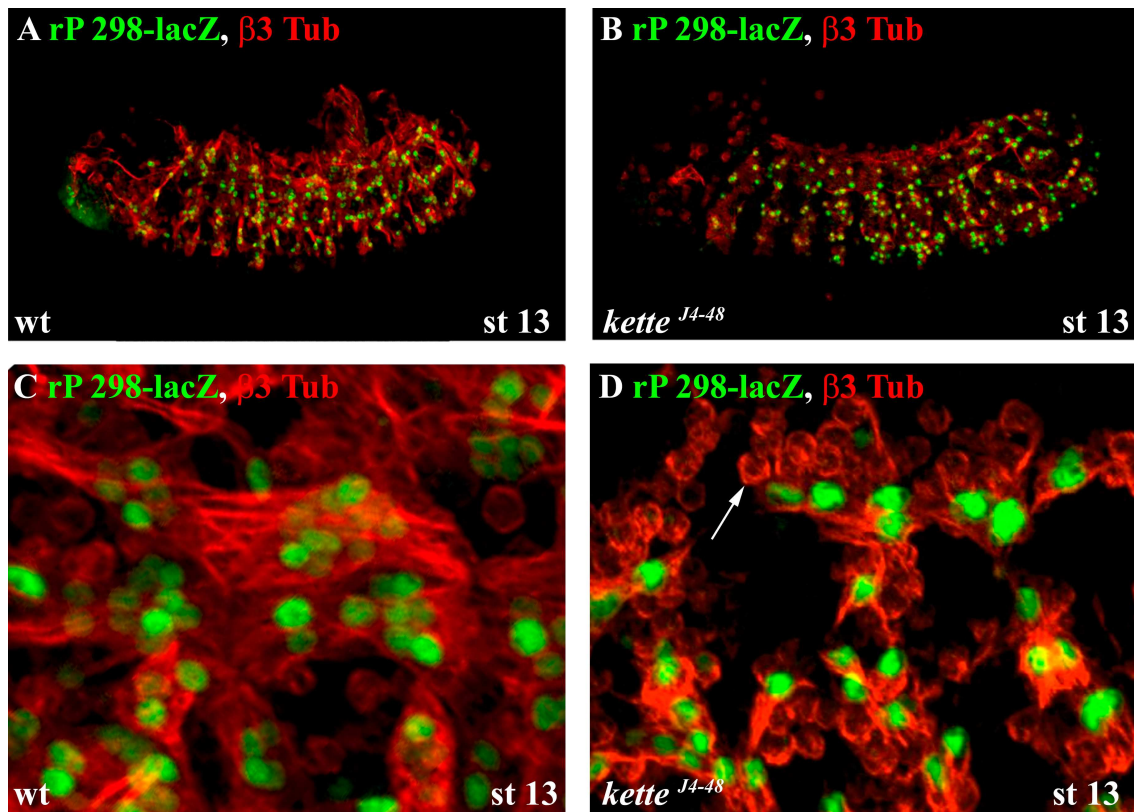
16.1. Beide Populationen somatischer Myoblasten werden in *blow*- und *kette*-mutanten Embryonen determiniert

Da auch Zellmigrations- oder Determinationsdefekte der Founder-Zellen oder fusionskompetenten Myoblasten Fusionsdefekte zur Folge hätten, wurde zunächst Folgendes festgestellt:

Wie in 15.1.3 beschrieben sind die fusionskompetenten Myoblasten des somatischen Mesoderms in *kette*- und *blow*-mutanten Embryonen vorhanden und enthalten das *sns*-Transkript (vgl. Abb. 15.1). In *blow*-mutanten Embryonen konnte durch immunhistologische Auswertung des eingekreuzten Enhancer-Trap-P-Elementes rP298-*lacZ* bereits früher festgestellt werden, dass die somatischen Founder-Zellen vorhanden sind (Schröter, Diplomarbeit 2003). Die analoge Auswertung von *kette*-mutanten Embryonen zeigt, dass auch hier die somatischen Founder-Zellen vorhanden sind (Abb. 16.1, A Wildtyp vergleiche mit B *kette*-Mutante). Die Gegenfärbung mit Hilfe eines immunhistologischen β 3-Tubulin-Nachweises zeigt jedoch deutlich, dass diese von einer Vielzahl nicht fusionierter fusionskompetenter Myoblasten umgeben sind (Abb. 16.1, D, Pfeil), während in Wildtyp-Embryonen bereits eine deutliche Ordnung der sich bildenden Muskeln eingetreten ist (Abb. 16.1, C). Bei einem β 3-Tubulin-Nachweis wird neben den somatischen Muskelzellen auch die Herzmuskulatur angefärbt. Da das Herz in beiden Mutanten korrekt geschlossen erscheint (vgl. Kapitel 3, 3.1 und 4, 4.1), kann davon ausgegangen werden, dass kein Dorsalschlussdefekt vorliegt, der sich sonst ebenfalls auf das Erscheinungsbild der somatischen Muskulatur auswirken könnte.

16.2. *blow*- und *kette*-mutante Embryonen bilden Muskelvorläufer, die bis zu vier Kerne enthalten

Als nächstes stellte sich die Frage, ob Kette und Blow im ersten, im zweiten oder ggf. in beiden somatischen Fusionsschritten eine Rolle spielen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde untersucht, ob in den entsprechenden Mutanten mehrkernige



*Abbildung 16.1.: kette-mutante Embryonen besitzen rP298-lacZ-positive somatische Founder-Zellen, die von einer Vielzahl unfusionierter Myoblasten umgeben sind: A-D grün: immunhistologischer β -Galactosidase-Nachweis im Kern zur Darstellung des Enhancer-Traps rP298-lacZ, rot: immunhistologischer β 3-Tubulin-Nachweis. A, C Wildtyp, Stadium 13, B, D *kette*^{J4-48}-mutanter Embryo, Stadium 13. A, B In beiden Fällen sind die rP298-lacZ positiven Founder-Zellen regelmäßig angeordnet. C, D höhere Vergrößerung von A bzw. B. D Pfeil: unfusionierte fusionskompetente Myoblasten.*

Precursor-Zellen gebildet werden. Sofern solche beobachtet werden, läßt sich darauf schließen, dass das jeweilige Gen bzw. sein Proteinprodukt zwar am zweiten Fusions-schritt jedoch nicht essentiell am ersten beteiligt ist. Aufgrund der Beobachtung von Doberstein et al. (1997), dass *blow*-mutante Embryonen nach der Ausbildung des nur im zweiten Fusions-schritt vorkommenden Präfusionskomplexes stoppen, liegt für *blown fuse* die Vermutung nahe, dass *Blow* im zweiten Fusions-schritt essentiell ist. Für *kette* gab es dagegen diesbezüglich keine Hinweise in der Literatur. Der zuvor durchgeführte immunhistologische Nachweis zur Klärung der Frage, ob *kette*-Mutanten somatische Founder-Zellen besitzen, deutete jedoch bereits an, dass auch

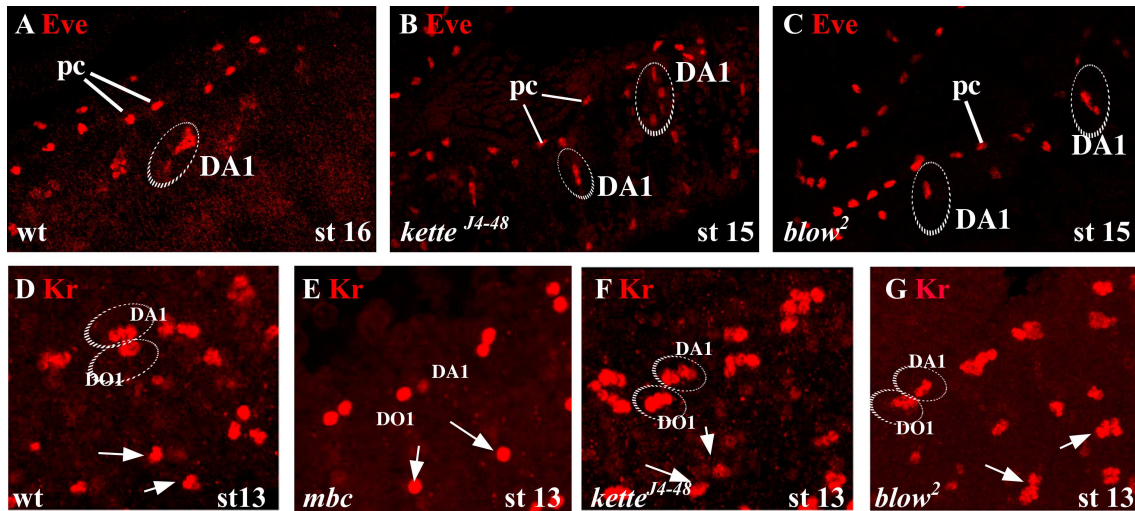


Abbildung 16.2.: *kette*- und *blow*-mutante Embryone bilden mehrkernige Muskelvorläufer-Zellen: A-C immunhistologischer Evenskipped-Nachweis, pc = Perikard-Zellen. D-G immunhistologischer Krüppel-Nachweis. A Wildtyp, Stadium 16, DA1 enthält deutlich mehr als vier Kerne. B *kette*^{J4-48}-mutanter Embryo, Stadium 15, DA1 enthält maximal drei bis vier Kerne. C *blow*²-mutanter Embryo, Stadium 15, DA1 enthält maximal drei Kerne. D Wildtyp, Stadium 13, die Krüppel-positiven Muskeln enthalten jeweils zwei bis drei Kerne. E *mbc*^{C1}-mutanter Embryo, die Krüppel-positiven Muskeln enthalten jeweils nur einen Kern, es hat also kein erster Fusionsschritt stattgefunden. F *kette*^{J4-48}-mutanter Embryo. G *blow*²-mutanter Embryo. F, G Die Krüppel-positiven Muskeln enthalten zwei bis drei Kerne. Die gestrichelten Linien verdeutlichen jeweils die zu einem Muskel bzw. einer Muskelvorläufer-Zelle gehörenden Kerne.

hier mehrkernige Muskelvorläufer gebildet werden (Abb. 16.1, D)

Zur genaueren Klärung dieser Frage wurde zunächst mit Hilfe von immunhistologischen Nachweisen der Proteine Evenskipped und Krüppel die Kernanzahl eines Subsets von somatischen Muskeln untersucht. Während der Muskel DA1 im Wildtyp nach den Fusionen ca. 14 Kerne enthält (Abb. 16.2, A, DA1), die Evenskipped exprimieren, konnten in *kette*- (Abb. 16.2, B) bzw. *blow*-mutanten Embryonen (Abb. 16.2, C) in vergleichbaren Entwicklungsstadien jeweils nur zwei bis vier Eve-positive Kerne festgestellt werden. Analog exprimieren die Founder mehrerer dorsaler, lateraler und ventraler Muskeln den Transkriptionsfaktor Krüppel und zeigen, dass nach Bildung der Muskelvorläufer-Zellen im Stadium 13 zwei bis drei Krüppel-positive Kerne pro zukünftigem Muskel vorhanden sind (Abb. 16.2, D). Die gleiche Situation ist in *kette* und *blow*-mutanten Embryonen des Stadium 13 anzutreffen (Abb. 16.2 F, G). Im Gegensatz dazu zeigen *mbc*-mutante Embryonen, von denen bekannt ist, dass sie während der ersten Fusion stoppen, jeweils nur einen Krüppel-positiven Kern pro Muskel (Abb. 16.2, E). Dies lässt darauf schließen, dass der erste Fusions-

schritt in *blow* und *kette*-mutanten Embryonen abläuft, die weiteren Fusionen nach der Bildung des dreikernigen Muskelvorläufers aber nicht mehr stattfinden.

Diese Beobachtungen bestätigen sich bei der Analyse von *blow*-, *kette*- bzw. *mbc*-mutanten Embryonen im Transmissions-Elektronen-Mikroskop (Abb. 16.3, A, B): Während *mbc*-mutante Embryonen im somatischen Mesoderm nur mononukleäre Zellen enthalten (Abb. 13.1, C), die zeigen, dass die erste Fusion nicht stattfinden konnte, sind im somatischen Mesoderm von *blow*- und *kette*-mutanten Embryonen deutlich Syncytien mit zwei (Abb. 16.3, B, Sterne) bis drei Kernen (Abb. 16.3, A, Sterne) sichtbar - die im ersten Fusions-Schritt gebildeten Muskelvorläufer-Zellen.

16.3. Die Myoblastenfusion von *kette*-mutanten Embryonen endet mit morphologisch aberranten elektronendichten Plaques

Zur genaueren Einordnung von *kette* innerhalb der Kaskade der im zweiten Fusions-schritt benötigten Gene wurde nun ein detaillierterer Vergleich mit dem ultrastrukturellen Ablauf der zweiten Fusion im Wildtyp herangezogen. Dort stellt sich der Ablauf der Fusion wie folgt dar: Zunächst werden innerhalb der ersten Kontaktstelle in beiden Zellen elektronendichte Vesikel sichtbar (Abb. 16.4, A Pfeilköpfe, B). Diese erscheinen anfänglich willkürlich angeordnet (Abb. 16.4, B), werden aber kurz darauf wie von Doberstein et al. (1997) beschrieben streng paarweise gegenüberliegend im

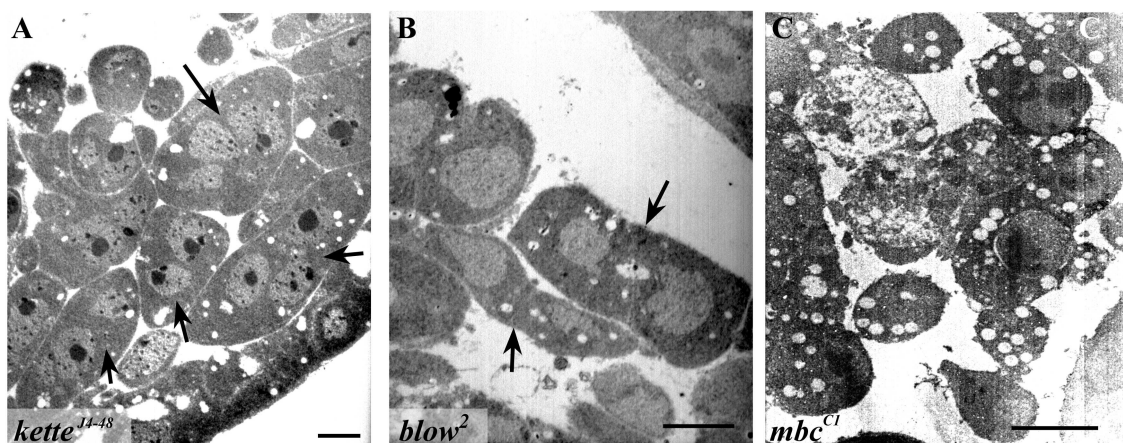


Abbildung 16.3.: Muskelvorläuferzellen von *kette*- und *blow*-mutanten Embryonen im TEM: A-C TEM an Querschnitten. A *kette*^{J4-48}-mutanter Embryo, Pfeile = zwei- bis dreikernige Muskelvorläufer-Zellen. B *blow*²-mutanter Embryo, Pfeile = zweikernige Muskelvorläufer-Zellen. C *mbc*^{C1}-mutanter Embryo, es liegen keine mehrkernigen Muskelvorläufer-Zellen vor.

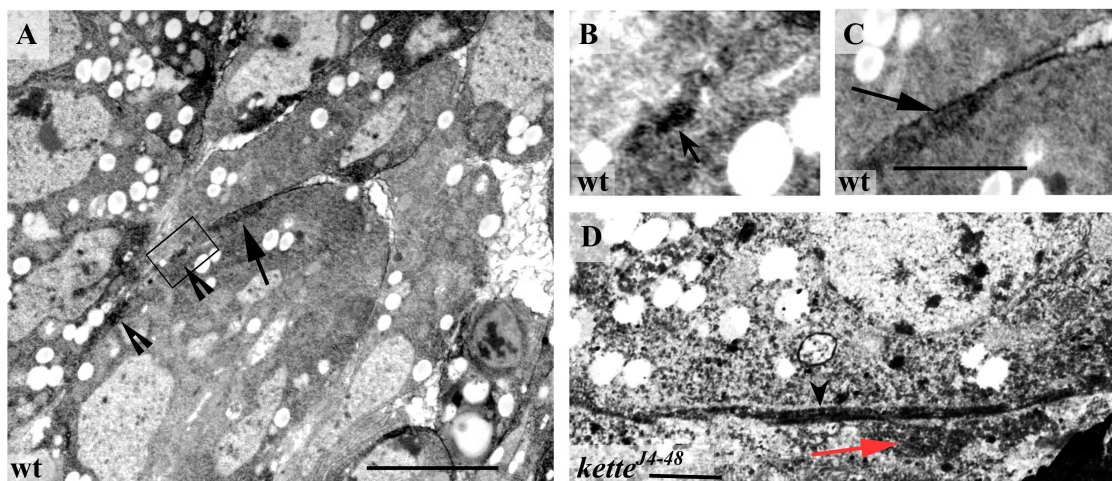


Abbildung 16.4.: *kette*-mutante Embryonen haben morphologisch aberrante elektronendichte Plaques: A-C TEM, Wildtyp. D TEM, *kette*^{J4-48}-mutanter Embryo, Stadium 15. A Während der Fusion zwischen einer fusionskompetenten Myoblaste und einer Muskulvorläufer-Zelle sind zunächst Gruppen elektronendichter Vesikel (Pfeilköpfe) zu erkennen. In deren Nachbarschaft befindet sich ein sich entwickelnder elektronendichter Plaque (Pfeil), Balken = 1,5 µm. B Die Ausschnittsvergrößerung von A zeigt eine Gruppe noch nicht paarig arrangerter elektronendichter Vesikel (Pfeil). C Die Ausschnittsvergrößerung von A zeigt den sich aus einer Wolke elektronendichten Materials (Pfeil) entwickelnden Plaque, Balken = 500 nm. D elektronendichter Plaque eines *kette*^{J4-48}-mutanten Embryos. Der Plaque (Pfeilkopf) ist deutlich länger und dünner als wildtypische Plaques. Pfeil = Reste elektronendichten Materials, Balken = 150 nm.

Präfusionskomplex organisiert. Während die Kontaktstelle sich ausdehnt und in der Nachbarschaft der so geordneten elektronendichten Vesikel neue elektronendichte Vesikel erscheinen, wird der erste Präfusionskomplex in einer Wolke aus elektronendichtem Material aufgelöst und zum elektronendichten Plaque umgebaut (Abb. 16.4, A, C höhere Vergrößerung von A, Pfeil). Während dieser Prozess in Richtung des neu gebildeten Präfusionskomplexes voranschreitet, beginnt unmittelbar auf der anderen Seite des elektronendichten Plaques der Membranzusammenbruch in dessen direkter Nachbarschaft. Im Folgenden wurden 22 Embryonen, die homozygot das amorphe Allel *kette*^{J4-48} trugen, in Bezug auf das Vorhandensein der genannten Ultrastrukturen untersucht. Da der zweite Fusionsschritt hauptsächlich während der Stadien 13 und 14 abläuft ist zu erwarten, dass die Fusionen im Stadium 15 nahezu vollständig abgelaufen sind. Sofern *kette*-Mutanten die Fusion bei einem aufgrund seiner Ultrastruktur beschreibbaren spezifischen Stadium stoppen, so sollte eine Anhäufung dieser Ultrastrukturen, die aus einer ganzen Reihe nicht korrekt abgelaufener zweiter Fusionen resultiert, beobachtbar sein. Mit Hilfe diese potentielle Anhäufung von

unfertigen Fusionsstadien, müsste erkennbar sein, an welchem Punkt des zweiten Schrittes der Stopp erfolgt. In allen untersuchten *kette*^{J4-48}-mutanten Embryonen wurde festgestellt, dass es im Stadium 15 zu einer Akkumulation elektronendichter Plaques kommt (Abb. 16.4, D). In keinem Fall konnte ein Membranzusammenbruch beobachtet werden und die jeweils involvierten Precursor-Zellen enthielten maximal vier Kerne. Darüberhinaus erscheinen die Plaques im Vergleich zum Wildtyp wesentlich elongiert - sie dehnen sich über einen Bereich von bis zu 1000 nm aus, während die Wildtyp-Plaques eine Ausdehnung von etwa 500 nm besitzen. Daneben erscheinen die Plaques in *kette*-mutanten weniger elektronendicht als im Wildtyp. Die Analyse von 12 *kette*-mutanten Embryonen der Stadien 12 bis 14 zeigte ausserdem, dass den aberranten Plaques vorausgehend der Präfusionskomplex gebildet wird. In der Umgebung der sich bildenden elektronendichten Plaques von *kette*-mutanten Embryonen sind häufig Reste elektronendichten Materials beobachtbar (Abb. 16.4, D, Pfeil), die vermutlich aus der Auflösung des Präfusionskomplexes resultieren. Da in *kette*-mutanten Embryonen in keinem Fall weder ein wildtypisch erscheinender Plaque noch ein benachbarter Membranzusammenbruch beobachtet werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die Störung der Fusion während der Bildung der elektronendichten Plaques stattfindet. In jedem Fall ist *kette* in der zeitlichen Kaskade aufgrund dieser Daten nach *blown fuse* einzuordnen, da *blow*-mutante Embryonen die Myoblastenfusion bekanntlich nach der Bildung des Präfusionskomplexes stoppen.

16.4. *kette*^{G1-37}-mutante Embryonen zeigen Fehler bei der Anheftung der somatischen Muskeln an die Epidermis

In Embryonen, die homozygot eines der hypomorphen *kette*-Allele tragen wurde häufig festgestellt, dass der Fusionsdefekt nicht so stark ausgeprägt ist, wie in Embryonen, die homozygot eines der amorphen Allele tragen. Es treten häufig einzelne normal erscheinende Muskeln im insgesamt jedoch gestört erscheinenden Muster auf (Abb. 16.5, A, E, Pfeilköpfe weisen auf morphologisch relativ normal erscheinende Muskeln). Hier konnte mit Hilfe einer immunhistologischen Markierung der Tendon-Zellen, die in der Epidermis als Verankerungspunkt dienen (Abb. 16.5, B, Pfeil: Verankerungspunkt des Muskels an der Tendon-Zelle), beobachtet werden, dass einige dieser intakt erscheinenden Muskeln nicht in der Lage sind, sich dort korrekt anzu-

heften (Abb. 16.5, F, Pfeile: Distanz zwischen anzuheftendem Muskel und Tendon-
zelle). Die markant zugespitzten Muskelenden weisen darauf hin, dass diese Muskeln
nicht gezielt in Richtung ihres Anheftungszieles auswachsen. Prägnant treten solche
Defekte bei Embryonen zutage, die homozygot mutant für den cytosolischen Aktin-
Regulator Scar/WAVE (Abb. 16.5, C, G) bzw. für den SH2-SH3-Adaptor Dreadlocks
(Dock) (Abb. 16.5 D, H) sind. Das in allen Fällen geschlossene Dorsalgefäß (Abb.
16.5, dv) zeigt an, dass kein prinzipieller Dorsalschlussdefekt, der als Sekundäreffekt
ebenfalls Fehlpositionierungen innerhalb des somatischen Mesoderms hervorrufen
kann, vorliegt.

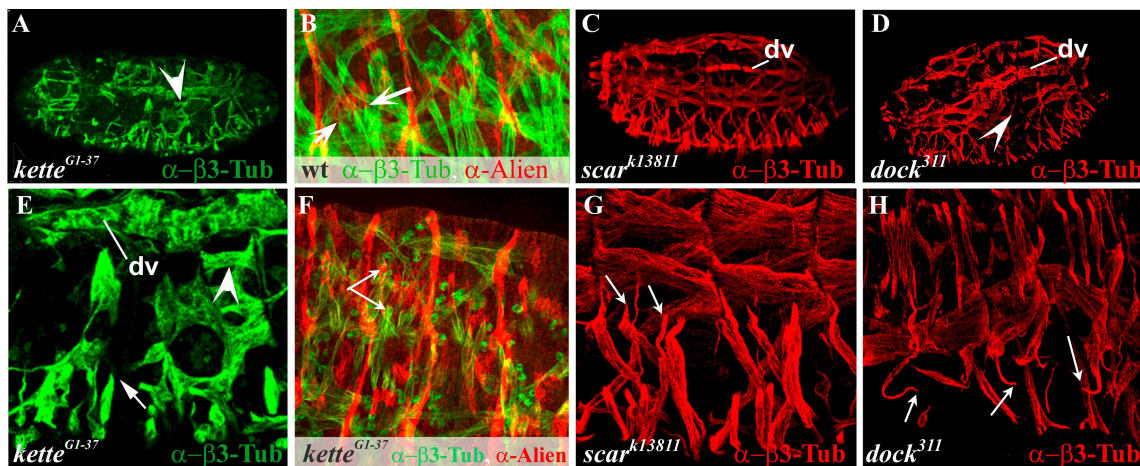


Abbildung 16.5.: *kette*-, *scar*- und *dock*-mutanten Embryonen haben Defekte bei der Verankerung der somatischen Muskeln in der Epidermis: A, C, D, E, G, H Immunhistologischer Nachweis von $\beta 3$ -Tubulin. B, F grün: Immunhistologischer Nachweis von $\beta 3$ -Tubulin, rot: Immunhistologische Markierung der Muskel-Tendon-Zellen mit Hilfe des α -alien-Antikörpers. A, E *kette*^{G1-37}-mutanter Embryo. E höhere Vergrößerung von A, das Dorsalgefäß (dv) ist korrekt geschlossen, Pfeil: fehlgeleiteter nicht verankerter Muskel, Pfeilköpfe: fast vollständig gebildete Dorsalmuskeln. B Wildtyp-Embryo, Pfeile: Die lateralen Muskeln sind durch die Muskel-Tendon-Zellen in der Epidermis verankert. F *kette*^{G1-37}-mutanter Embryo: Die lateralen Muskeln zeigen Fehler beim Finden der Tendon-Zellen (Pfeile). C, G *scar*^{k13811}-mutanter Embryo, G höhere Vergrößerung von C. Geschlossenes Dorsalgefäß (dv), Pfeile: fehlgeleitete laterale Muskeln. D, H *dock*³¹¹-mutanter Embryo, geschlossenes Dorsalgefäß (dv), Pfeile: fehlgeleitete Muskelenden.

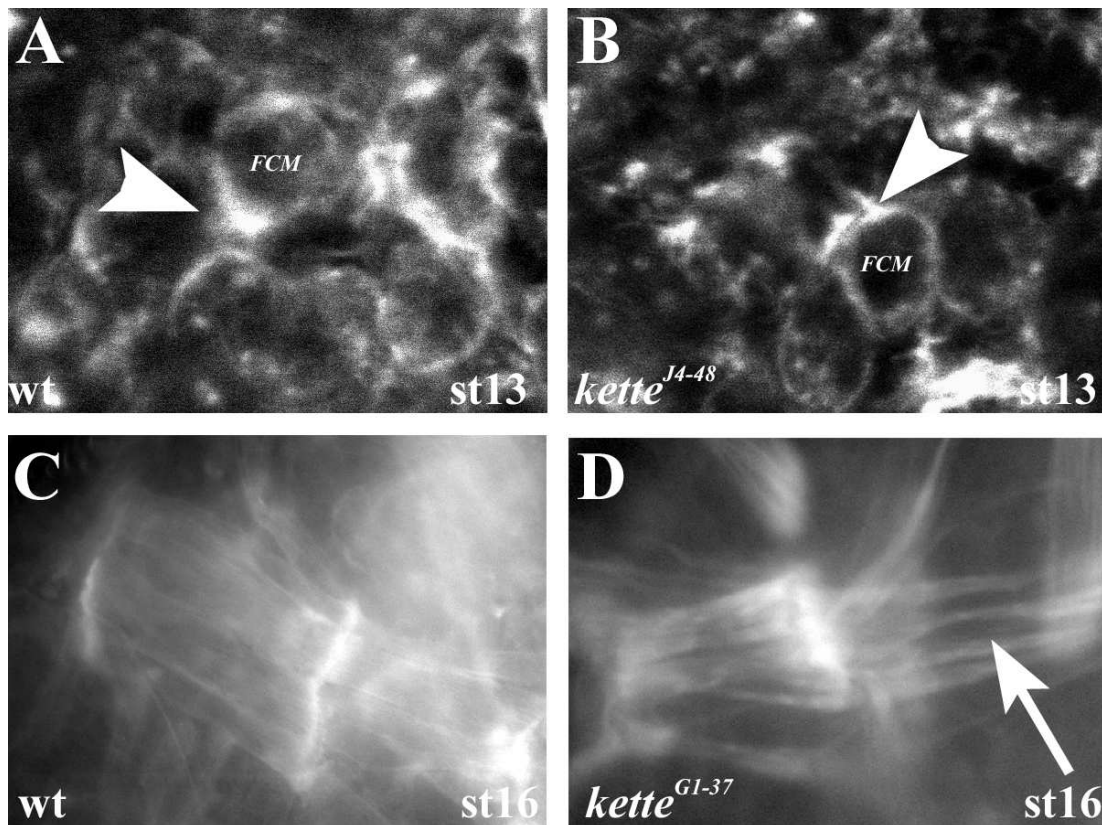


Abbildung 16.6.: *kette*-mutante Embryonen zeigen Unregelmäßigkeiten beim Arrangement des filamentären Aktins: A-D TRITC-Phalloidin-Nachweis filamentären Aktins. **A** Wildtyp, Stadium 13. Pfeilkopf: An der Kontaktstelle zwischen zwei somatischen Fusionspartnern bildet sich ein Aktin-Focus. **B** *kette*^{J4-48}-mutanter Embryo, Stadium 13. Pfeilkopf: Der Aktin-Focus ist gegenüber dem Wildtyp vergrößert und deutlich unregelmäßig. **C** Wildtyp, Stadium 16. In den fertigen somatischen Muskeln ist das filamentäre Aktin regelmäßig geordnet. **D** *kette*^{G1-37}-mutanter Embryo, Stadium 16. Pfeil: Die F-Aktin-Anordnung hat deutliche Lücken. FCM = fusionskompetente Myoblaste

16.5. *kette*^{J4-48}-mutante Embryonen haben vergrößerte, unregelmäßige Aktin-Foci während *kette*^{G1-37}-mutante Embryonen Lücken im Aktin-Arrangement der somatischen Muskeln zeigen

Da es sich bei Kette um einen bekannten Regulator des Aktin-Zytoskelettes handelt, wurde in *kette*-mutanten Embryonen mit Hilfe von TRITC-Phalloidin analysiert, ob es zu einer Beeinflussung des Arrangements filamentären Aktins in den somatischen Muskeln kommt. Dabei wurde zum einen in Embryonen mit dem amorphen Allel *kette*^{J4-48} im Stadiums 13 beobachtet, dass die Aktin-Foci an den Kontaktstellen zwischen Muskelvorläufer-Zelle und fusionskompetenter Myoblaste gegenüber der

Wildtyp-Situation vergrößert und unregelmäßig erscheinen (Abb. 16.6, A Wildtyp vergleiche mit B *kette*-mutanter Embryo, Pfeilköpfe weisen auf Aktin-Focus). Bei Embryonen, die, verursacht durch das Allel *kette*^{G1-37}, einen schwachen *kette*-Phänotyp zeigen, wurden zum anderen Lücken im Aufbau des filamentären Aktin-Systems der somatischen Muskeln beobachtet (Abb. 16.6, C, D).

17. Zusammenspiel von Kette und Blow

17.1. Im somatischen Mesoderm agiert Kette downstream von Blow

Die oben beschriebene TEM-Analyse gab bereits den ersten Hinweis darauf, dass Kette downstream von Blow agiert. Dies wurde mit Hilfe zweier weiterer Experimente überprüft: Zum einen wurden Doppelmutanten von *kette* und *blow* analysiert, zum anderen wurden Rettungsexperimente mit Hilfe von ektopisch exprimiertem Kette durchgeführt.

17.1.1. *kette* und *blow* interagieren genetisch miteinander

Zur Analyse einer möglichen genetischen Interaktion wurden Fliegen verwendet, die auf dem zweiten Chromosom die Mutation *blow*² balanciert über dem Blaubalancer CyO-hglacZ sowie auf dem dritten Chromosom die Mutation *kette*^{G1-37} balanciert über den Blaubalancer SbTDLZ trugen. Die genetischen Verhältnisse im Embryo wurden dann anhand des Vorhandenseins des jeweiligen Blaubalancers durch immunhistologischen Nachweis von β -Galactosidase bestimmt. Für dieses Experiment war es essentiell, die homozygote und heterozygote Situation bezüglich der Balancer zu unterscheiden. Dies wurde mit Hilfe des charakteristischen Phänotyps der nur

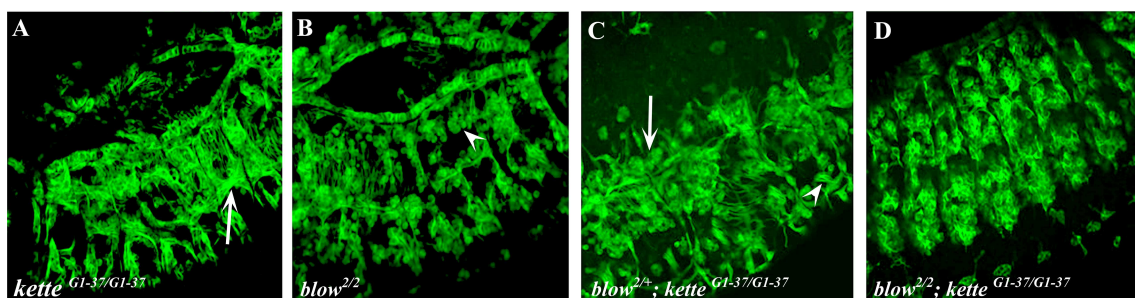


Abbildung 17.1.: *kette* und *blow* interagieren während der somatischen Myoblastenfusion genetisch miteinander: **A-D** Stadium 15, Immunhistologischer Nachweis von β -3-Tubulin. **A** Embryo homozygot für das hypomorphe Allel *kette*^{G1-37}. **B** Embryo homozygot für das Null-Allel *blow*². **C** homozygoter *kette*^{G1-37}-Embryo, mit einer Kopie *blow*², Pfeil: unfusionierte Myoblasten treten vermehrt auf. **D** Doppelmutante, homozygot für *blow*² und *kette*^{G1-37}, der Fusionsdefekt ist noch dramatischer verstärkt im Vergleich zu **C**.

in der homozygoten Situation auftritt bewerkstelligt. Die Phänotypen die durch die Allele *kette*^{G1-37} (Abb. 17.1, A) bzw. *blow*² (Abb. 17.1, B) hervorgerufen werden, mit einem immunhistologischen Nachweis von β 3-Tubulin gut unterscheidbar. Während in *kette*^{G1-37}-mutanten Embryonen häufig wildtypisch aussehende Muskeln zu finden sind (Abb. 17.1, A, Pfeil), sind für *blow*²-mutante Embryonen Nester unfusionierter Myoblasten typisch, die mit Muskelvorläufer-Zellen in Kontakt stehen (Abb. 17.1, B, Pfeilkopf). Es zeigte sich, dass homozygote *kette*^{G1-37}-Embryonen, die heterozygot ein Kopie *blow*² tragen, eine Verstärkung ihres Phänotyps erfahren (Abb. 17.1, C). Das äußert sich vor allem in einem Zuwachs der Menge der unfusionierten Myoblasten (Abb. 17.1, C, Pfeil). Sie stehen häufig in Kontakt mit scheinbar fusionierten Minimuskeln, bei denen es sich um Muskelvorläufer-Zellen handelt (Abb. 17.1, C, Pfeilkopf). Dies ist in ähnlicher Weise typisch für homozygote *blow*²-mutante Embryonen (vgl. Abb. 17.1, B, s.o.), dagegen zeigen homozygote *blow*²-Embryonen, die heterozygot *kette*^{G1-37} tragen, den typischen *blow*-Phänotyp (ohne Abbildung). Doppelmutanten, die sowohl homozygot für *blow*² als auch für *kette*^{G1-37} sind, lassen darüberhinaus nochmals eine deutliche Verstärkung des *kette*-Phänotyps erkennen (Abb. 17.1, D). Damit bestätigt sich der Schluss, dass Kette während der somatischen Myoblastenfusion downstream von Blow agiert, und es zeigt sich außerdem, dass *kette* und *blow* während dieses Prozesses genetisch miteinander interagieren.

17.1.2. Ein Überschuss an Kette rettet den *blow*-Phänotyp partiell

Da es sich bei allen analysierten *kette*-Allelen um EMS-induzierte Punktmutationen handelt und bei dieser Methode der Mutagenese häufig mehrere Mutationen in verschiedenen Genen auf einem Chromosom gleichzeitig entstehen, wurde mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems geprüft, ob es sich bei dem getroffenen und analysierten Gen tatsächlich um das für Kette codierende Gen handelt. Zunächst wurde mit Hilfe eines *twist*-Gal4-Treibers ein Überschuss an Kette im Wildtyp-Mesoderm exprimiert. Bei Analyse mit Hilfe des β 3-Tubulin Antikörpers konnte keine Störung des somatischen Muskelusters festgestellt werden. Es kann also geschlossen werden, dass ein Überschuss an Kette keinen nachteiligen Effekt auf die Myoblasten-Fusion im somatischen Mesoderm hat (Simone Lier, mündliche Mitteilung).

Als nächstes wurde wiederum Kette im Mesoderm von *kette*^{J4-48}-homozygoten Embryonen mit Hilfe eines *twist*-Gal4-Treibers exprimiert. Dies resultierte in einem na-

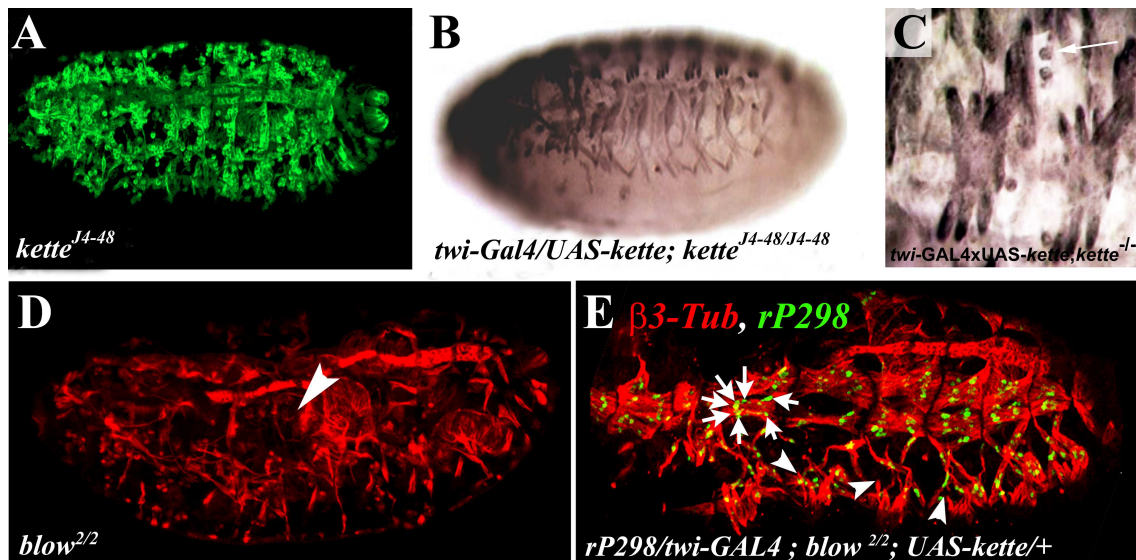


Abbildung 17.2.: Ektopische Expression von Kette im somatischen Mesoderm von *kette*- und *blow*-mutanten Embryonen: A-D Immunhistologischer Nachweis von $\beta 3$ -Tubulin. E Immunhistologischer Doppelnachweis von $\beta 3$ -Tubulin und β -Galactosidase zur Darstellung von rP298-*lacZ*. A-E Stadium 16. A *kette*^{J4-48}-mutanter Embryo mit starkem Fusionsphänotyp. B, C Ektopische Expression von Kette in der *twist*-Domäne mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems rettet den durch den *kette*^{J4-48}-mutanten Hintergrund erzeugten Phänotyp (vgl. A). C Nur wenige unfusionierte Myoblasten sind zu finden (Pfeil). D *blow*^{2/2}-mutanter Embryo mit großen Lücken im somatischen Mesoderm (Pfeilkopf). Die meisten unfusionierten Myoblasten wurden von Macrophagen entfernt. E Ektopische Expression von Kette in der *twist*-Domäne *blow*²-mutanter Embryonen retten den *blow*²-Phänotyp partiell. Die dorsalen Muskeln enthalten deutlich mehr als drei Kerne (Pfeile). Die Pfeilköpfe weisen auf fehlgeleitete Muskelenden.

hezu korrekt ausgebildeten Muskelmuster (Abb. 17.2, B, C, vgl. mit *kette*-mutantem Embryo in A), in dem nur wenige unfusionierte Myoblasten (Abb. 17.2, C, Pfeil) und selten fehlorientierte Muskeln zu finden sind. Es kann also geschlossen werden, dass es sich bei dem durch EMS-Mutagenese generierten Phänotyp tatsächlich um einen Phänotyp handelt, der in der Mutation des Gens *kette* begründet liegt.

Da, wie oben beschrieben, *kette* und *blow* im somatischen Mesoderm genetisch miteinander interagieren, wurde als nächstes untersucht, welchen Effekt ein Überschuss an Kette in *blow*-mutanten Embryonen hat. Dazu wurde Kette erneut mit einem *twist*-Gal4-Treiber diesmal im Mesoderm von *blow*²-homozygoten Embryonen exprimiert. Zusätzlich trugen diese Fliegen den Enhancer-Trap rP298-*lacZ*. In *blow*-mutanten Embryonen des Stadiums 16 fallen große Lücken im dorsalen Bereich des somatischen Mesoderms auf, die entstehen nachdem eingewanderte Makrophagen die unfusionierten fusionkompetenten Myoblasten entfernt haben (Abb. 17.2, D,

Pfeilkopf). Der mit Hilfe des UAS-Gal4-Systemes induzierte Überschuss an Kette führt zu einer partiellen Rettung des somatischen *blow*-Phänotyps (Abb. 17.2, E, vgl. *blow*-mutanter Embryo in D). Dabei fallen wieder vor allem die dorsalen Muskeln ins Auge, die eindeutig mehr als die für *blow*-mutante Embryonen typischen zwei bis drei rP298-*lacZ* positiven Kerne besitzen (Abb. 17.2 E, Pfeile, vgl. 16.2, Seite 108). Es sind jedoch auch deutliche Defekte bei der Anordnung und Ausbildung der lateralen Muskeln erkennbar (Abb. 17.2, E, Pfeilköpfe).

17.2. Im viszeralen Mesoderm kann keine zeitliche Reihung zwischen Blow und Kette festgestellt werden

Die Auswertung der oben beschriebenen Doppelmutanten (17.1.1) ließ für das viszerale Mesoderm keinen Schluss über eine mögliche genetische Interaktion oder zeitliche Reihenfolge der Wirkung von Blow und Kette während der Entwicklung der zirkulären viszeralen Muskeln zu. Wie unter 15.3 (Seite 106) beschrieben, wurde beobachtet, dass es zu einem Defekt bei der Streckung der Ringmuskeln um den Darm kommt. Dabei zeigt der Phänotyp der Doppelmutante sowohl gelegentlich Lücken im Muster, die analog zum Phänotyp von *blow*-mutanten Embryonen sind, als auch eine sehr begrenzte Streckung um den Darm, die analog zum *kette*-Phänotyp ist.

18. Aufstellung einer Hypothese zur Funktion und evolutionären Konservierung des Proteins Blown fuse

18.1. Das PH-Domänen-Protein Blown fuse kann vermutlich durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert werden und aufgrund seiner Primärstruktur mit SH2- und SH3-Domänen wechselwirken

Zur Aufstellung einer Hypothese über die mögliche Funktion des Proteins Blown fuse während der Myogenese von *Drosophila* wurde zunächst eine computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz durchgeführt. Sofern nicht anders festgehalten wurde dafür Expasy-Tools (Gasteiger et al., 2003) verwendet.

18.1.1. Molekulargewicht und pI

Blow umfasst insgesamt 644 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 69,4 kD und hat einen theoretischen pI von 5,98. Für einen tryptischen Verdau werden insgesamt 65 Schnittstellen vorhergesagt.

18.1.2. Globale Protein-Domänen und zytologische Lokalisation

Die Aminosäuren 206 bis 306 umfassen eine konservierte Pleckstrin-Homologe-Domäne (PH-Domäne). Blow wird als nicht-sekretorisches, cytoplasmatisches Protein vorhergesagt. Aufgrund der PH-Domäne ist jedoch eine Lokalisation im Kontext filamentären Aktins bzw. in der Nähe der Zellmembran wahrscheinlich (Lemmon et al., 2000). Dies korreliert mit der unter 14.1 (Seite 94) beschriebenen, beobachteten Kolo-kalisation mit filamentärem Aktin.

18.1.3. Peptid-cutter, Signalpeptide und posttranslationale Modifikation

Um einen möglichen Hinweis auf eine posttranslationale Modifikation durch Spaltung in mehrere Polypeptid-Ketten zu erhalten, wurde nach maximal zweifach vorkommenden Signalstellen für eine Peptid-Spaltung gesucht. Dabei wurden an den

Aminosäurepositionen 5 und 280 Spaltungen mit Hilfe der Prolin-Endopeptidase, eine Formamid-Spaltstelle bei 280 und eine Hydroxylamin-Spaltstelle bei 465 gefunden. Da die Spaltstelle 280 innerhalb der vorhergesagten funktionalen Domäne von Blown fuse liegen (siehe oben), wird davon ausgegangen, dass die entsprechenden Peptidasen maximal an der Degradation, jedoch nicht an der posttranslationalen Modifikation des Proteins beteiligt sind. Auch auf eine Signalkaskaden-relevante Spaltung durch Hydroxyamin gibt es keinerlei Hinweise. Es wurde kein N-terminales Signalpeptid und auch kein Kernlokalisierungssignal gefunden, jedoch insgesamt 6 Tyrosin-basierende Sortierungs-Signale an den Positionen 110, 130, 192, 349, 564 und 627, die auf eine funktionelle Assoziation mit dem Transport von Vesikeln an Membranen hindeuten. Es wurden keine signifikanten Hinweise auf eine posttranslationale Modifizierung durch Acetylierung, Glycosylierung, Methylierung, Sumoylierung oder Ubiquitylierung gefunden.

18.1.4. Putative posttranslationale Modifizierung durch Phosphorylierung

Zur posttranslationalen Modifizierung wurden insgesamt 45 Serin-, 9 Threonin- und 12 Tyrosin-Reste mit Hilfe von NetPhos2.0 (Blom et al., 1999) vorhergesagt. Dabei wurden nur Phosphorylierungen berücksichtigt, die mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50% vorhergesagt wurden. Aminosäuren, die sich innerhalb der PH-Domäne befinden, sind in Tabelle 18.1 in Klammer aufgeführt, und werden bei der weiteren Analyse ebenfalls nicht berücksichtigt.

18.1.5. Suche nach Bindemotiven für Protein-Protein-Wechselwirkungen

Mit Hilfe des ELM-Servers (Puntervoll et al., 2003) wurden Bindestellen für die mögliche Interaktion mit den im Folgenden aufgelisteten Protein-Protein-Interaktionsdomänen gefunden (Tab. 18.2), die jeweiligen konservierten Bindemotive sind in Klammer nach der jeweiligen Domäne aufgeführt: Klassische SH2-Domäne (pY[Q-DEVAIL][DENPYHI][IPVGAHS]), Grb-like SH2-Domäne (Y.N.), PTP2-like SH2-Domäne (Y[IV].[VILP]), Klasse I ([RKY]..P..P), Klasse II (P..P.[KR]) und nicht-kanonische SH3-Domänen (..[PV]..P), WW-Domänen der Gruppe III (.PPR.) und Gruppe IV (...[ST]P.), PDZ-Domänen (.[DE].[IVL]), FHA-Domäne (T.[ILA]) und IQ-Domäne (...[SACLIVTM]..[ILVMFCT]Q.{3}[RK].{4,5}[RKQ]). Ferner ist die Interaktion mit den Proteinen 14-3-3 und Cyclin aufgrund spezifischer Bindemotive

Tabelle 18.1.: **Putative Phosphorylierungs-Stellen in der Aminosäure-Sequenz von Blown fuse.**

Eingeklammerte Aminosäure-Positionen zeigen die Lokalisation innerhalb der PH-Domäne an, fettgedruckte Aminosäure-Positionen das Vorhandensein eines spezifischen Kinase-Substratmotives.

Aminosäure	Gesamt-Anzahl	Position
Serin	45	27, 31, 66, 68, 70, 92 , 116 , 118, 120, 122, 123 , 125, 127, 136, 143 (205, 249, 250, 257, 258), 314, 333 , 346, 368, 392, 397 , 399, 451 , 462 , 464, 467 , 477 , 492, 495, 498, 499 , 502, 532 , 541, 559 , 574 , 583, 599, 603, 617
Threonin	9	7, 8, (206, 224), 318 , 391, 436, 481, 636
Tyrosin	12	33, 130 , 192, (208, 228, 239, 253, 287), 335, 342 , 463, 556, 564

möglich. Auch hier wurden Bindestellen innerhalb der PH-Domäne nicht berücksichtigt sowie ELMs, die für Proteine spezifisch sind, die nicht in *Drosophila* vorkommen, und ELMs, die eindeutig eine nicht-cytosolische Lokalisation erfordern, nicht berücksichtigt.

Zusätzlich wurde mit Hilfe von Scansite 2.0 (Obenauer et al., 2003) eine Suche nach Bindestellen für Domänen spezifischer Proteine durchgeführt. Dabei wurde ein medium-sensitiv-Motiv-Scan verwendet und folgendes Resultat erhalten: Nach erfolgter posttranslationaler Modifizierung durch Phosphorylierung kann die Aminosäure Tyrosin an Position 342 mit ihrem umgebenden Aminosäuremuster von den SH2-Domänen der Kinasen der Src-Familie, der Abelson-Kinase, der Fyn-, der Itk- und der Lck-Kinase erkannt werden. Ausserdem ist eine Erkennung durch die SH2-Domänen der SH2-SH3-Adaptor-Proteine Crk und Nck möglich. Weiterhin könnte eine Interaktion mit der N-terminalen SH2-Domäne von PLC γ an Position Y130 stattfinden. Auch für die Positionen Y110 und Y378 sowie Y564 wurden mögliche Interaktionen mit SH2-Domänen vorhergesagt. Da es dort jedoch nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit zu Phosphorylierungen kommt, werden diese im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Für eine Interaktion mit SH3-Domänen kommen die Aminosäuren P325, die mit der SH3-Domäne der Src-Kinasen und der Abelson-Kinase interagieren kann, und die Aminosäure P360, die mit der SH3-Domäne von Crk und Grb2 interagieren kann, in Frage. Die Vorhersage der Interaktion von P325

mit der SH3-Domäne der Abelson-Kinase wird jedoch mit einer etwas geringeren Wahrscheinlichkeit als die anderen genannten getroffen und nur mit Hilfe eines low-sensitivity-Scans aufgedeckt. Da der Wert jedoch knapp nur knapp unterhalb der Grenze zur signifikanten Detektion mittels eines medium-sensitivity-Scans liegt und aufgrund des beobachteten Phänotyps (siehe unten) eine Beteiligung der Abelson-kinase an der Myoblastenfusion nicht unwahrscheinlich erscheint, wird sie trotzdem mit einbezogen. Schließlich ist eine Interaktion mit dem Protein 14-3-3 an Position T494 möglich.

Tabelle 18.2.: **Bindemotive für spezifische Protein-Protein-Interaktionsdomänen in der Aminosäure-Sequenz von Blown fuse.**

Bindemotive innerhalb der PH-Domäne wurden nicht berücksichtigt. p-S = ein phosphoryliertes Serin ist Voraussetzung für eine Interaktion, p-T = ein phosphoryliertes Threonin ist Voraussetzung für eine Interaktion, p-Y = ein phosphoryliertes Tyrosin ist Voraussetzung für eine Interaktion.

Putative Bindedomäne	erforderliche Modifizierung oder Position	Position
<i>Mit Hilfe des ELM-Servers vorhergesagte Bindemotive:</i>		
14-3-3 (Motif2)	p-S oder p-T	490
14-3-3	p-S oder p-T	323, 365, 394, 491, 597
Cyclin 1		322
FHA	p-S oder p-T	7, 8, 36, 48, 334, 528
IQ		473
PDZ 3	C-terminale Position	55, 94, 111, 128, 338, 402, 452, 469, 505, 543, 604, 627
SH2-Domäne (Grb-like)	p-Y	33, 463
SH2-Domäne (PTP2-like)	p-Y	130
SH2-Domäne (klassisches Motif)	p-Y	342, 627
SH3-Domäne Klasse I		322, 378
SH3-Domäne Klasse II		360
SH3-Domäne Klasse I (nicht-kanonisch)		141, 322, 357, 378, 381, 476, 565, 569, 626
WW-Domäne, Gruppe III		319
WW-Domäne, Gruppe IV	p-S	113, 115, 315, 323, 343, 365, 448, 470, 474, 478, 492, 496, 529, 556, 567, 571, 633

Tabelle 18.2.: Bindemotive

Mit Hilfe von Scansite2.0 vorhergesagte Bindestellen für Domänen spezifischer Proteine:

Lck SH2-Domäne	p-Y	Y342
Abl SH2-Domäne	p-Y	Y342
Src SH2-Domäne	p-Y	Y342
Nck SH2-Domäne	p-Y	Y342
Fyn SH2-Domäne	p-Y	Y342
Itk SH2-Domäne	p-Y	Y342
Crk SH2-Domäne	p-Y	Y342
Fgr SH2-Domäne	p-Y	Y342
Grb SH2-Domäne	p-Y	Y33
Scr SH3-Domäne		P325
Abl SH3-Domäne		P325
Crk SH3-Domäne		P360
Grb2 SH3-Domäne		P360
14-3-3	p-T	T494

18.1.6. Substratmotive, die von spezifischen Proteinkinasen erkannt werden

Ebenfalls mit Hilfe des ELM-Servers wurden verschiedene Motive gefunden, die als Substrat für Serin-/ Threonin- oder Tyrosin-Kinasen dienen können. Es handelt sich dabei um die Serin-/Threonin-Kinasen CDK (...([ST])P.[KR]) , CK1 (S..([ST])..), CK2 (...([ST])..E) , PKA (.R.([ST])...) und mehrere Motive für die Phosphorylierung durch Prolin-dirigierte Kinasen (...([ST])P..), wie z.B. MAPK.

Auch hier wurde zum Vergleich ein medium-sensitivity-Motif-Scan mit Scansite 2.0 (Obenauer et al., 2003) herangezogen. Dieser lieferte folgende putativen Phosphorylierungs-Stellen an Substratmotiven: Y342 kann durch die Abelson-Kinase und mit etwas geringerer Wahrscheinlichkeit durch die Src-Kinasen phosphoryliert werden. Die Src-Kinasen können ausserdem Y349 phosphorylieren, was jedoch bei der Analyse mit NetPhos2.0 als unwahrscheinlich vorhergesagt wurde. Y130 kann durch Interaktion mit dem EGF-Rezeptor und dem PDGF-Rezeptor phosphoryliert werden und Y110 durch Interaktion mit dem Insulin-Rezeptor. Nach Vergleich mit der durch NetPhos2.0 durchgeführten Analyse erscheinen darüberhinaus folgende Aminosäurepositionen als möglicherweise durch eine Serin-/Threonin-Kinase modifiziert (vgl. Tabelle 18.3): S92, S116, S123, T318, S333, S397, S451, S462, S467, S477, T481, S532, S559, S574, T636.

Tabelle 18.3.: **Substratmotive für putative Phosphorylierungen durch spezifische Kinasen.**

Es wurden nur Positionen berücksichtigt, für die eine mögliche Phosphorylierung vorhergesagt wurde. ProDKin = Prolin-dirigierte Kinase.

Kinase	Substrat	möglicherweise phosphorylierte Positionen in Blow
<i>Vorhersagen mit Hilfe des ELM-Severs:</i>		
CDK	Serin oder Threonin	116, 118, 120, 451, 481
CK1	Serin oder Threonin	27, 66, 68, 70, 120, 122, 123, 125, 127, 136, 333, 464, 467, 477, 492, 495, 498, 499, 502, 574, 617
CK2	Serin oder Threonin	27, 33, 66, 68, 70, 464, 467, 541, 614
PKA	Serin oder Threonin	27, 92, 143, 333, 492, 495
ProDKin	Serin oder Threonin	116, 118, 120, 318, 346, 368, 451, 477, 481, 492, 498, 499, 502, 532, 559, 574, 636
<i>Vorhersagen mit Hilfe von Scansite2.0:</i>		
<i>Tyrosin-Kinasen</i>		
Abelson- und Src-Kinase	Tyrosin	Y342
Src- und Lck-Kinase	Tyrosin	Y349
PDGFR und EGFR	Tyrosin	Y130
IR	Tyrosin	Y110
<i>Serin-/Threonin-Kinasen</i>		
Erk1	Serin oder Threonin	T318, S532, T636
PKC delta	Serin	S462
PKC epsilon	Serin	S333, S123
Proteinkinase A	Serin	S92
Akt-Kinase	Serin	S397
Clk2	Serin	S397
CK1	Serin	S467

Tabelle 18.3.: Substratmotive

GSK3	Serin	S116, S477
Cdk5	Serin oder Threonin	T318, S451, S574
Cdc2	Serin oder Threonin	T318, S574, T481, S559

18.1.7. Korrelierung der putativen Phosphorylierungs-Stellen mit den gefundenen Protein-Binde- und Substratmotiven

Da für einige Protein-Protein-Interaktionen modifizierte Aminosäuren innerhalb der Bindemotive Voraussetzung sind, wurde zunächst das jeweilige gefundene Bindemotiv daraufhin überprüft, ob eine der putativen Phosphorylierungs-Stellen mit ihm korreliert und ob es gegebenenfalls zusätzlich ein Substratmotiv für eine der oben aufgeführten Kinasen darstellt oder enthält. Bindemotive, die eine Phosphorylierung erfordern, ohne dass eine solche mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50 % vorhergesagt wurde, wurden im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Insgesamt stellt sich das Protein Blown fuse auf der Grundlage seiner Aminosäure-Sequenz dann wie folgt dar (Abb. 18.1): N-Terminal befindet sich ein Motiv, das nach Threonin-Phosphorylierung in der Lage ist mit FHA-Domänen zu interagieren. Es wird dicht gefolgt von einer putativen Tyrosin-Phosphorylierungs-Stelle in einem SH2-Domänen-Bindemotiv. Weiterhin finden sich im N-terminal der PH-Domäne an der Position 113-120 ein WW-Domänen-Bindemotiv und an der Position 141-147 ein SH3-Domänen-Bindemotiv. Im Anschluss an die PH-Domäne, die sich von Position 205 bis 306 erstreckt, findet sich an Position 322-328 ein typisches Bindemotiv für SH3-Domänen der Klasse I, wie z.B. die SH3-Domäne der Src-Kinase und der Abl-Kinase. Dieses identische Motiv kann ebenfalls durch WW-Domänen der Gruppe III, sowie die Proteine 14-3-3 und Cyclin erkannt werden. An Position 341-347 findet sich ein typisches Substratmotiv für die Abelsonkinase, das jedoch auch als unspezifischeres Motiv für Kinasen der Src-Familie dienen kann. Nach erfolgter Phosphorylierung des Tyrosin an Position 324 kann dieses Motiv durch SH2-Domänen, z.B. die der Proteine Crk, Nck, Abl, Src, Fyn, Itk und Fgr, erkannt und gebunden werden. Im weiteren C-terminalen Bereich finden sich von Position 357 bis 370, sowie von Position 470 bis 492 und von 556 bis 576 jeweils Sequenzbereiche, die mehrfachüberlappende Bindemotive für SH3-Domänen, WW-Domänen

Seit 2003 wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Hefe-Zwei-Hybrid-Massenscreens durchgeführt und in verschiedenen Datenbanken archiviert. Diese wurden mit Hilfe der *Drosophila*-Interactions-Database (Pacifico et al., 2006) und BioGrid (Stark et al., 2006) nach möglichen Interaktionspartnern von Blown fuse durchsucht. Alle Hefe-zwei-Hybrid-Daten, die Blown fuse als Interaktionspartner benennen, stammen aus dem Screen der 2003 von Giot et al. durchgeführt wurde. Dabei wurden insgesamt 10 mögliche Interaktionen gefunden, darunter die Möglichkeit, dass Blow mit sich selbst interagiert. Neben sechs durch die Computational Genes CG11164, CG13095, CG17265, CG40460, CG6486 und CG6770 codierten Proteinen, wurden Interaktionen mit der Serin-/Threonin-Kinase Pk17E und der Ribosomenuntereinheit RpS30 bestimmt. Die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit angegebene Interaktion, ist jedoch die mit dem SH2-SH3-Adaptor-Protein Crk.



Da im Kontext der zuvor durchgeführten in-silico-Analyse der Proteinsequenz von Blown fuse die beiden Kandidaten Pk17E und Crk als am interessantesten erschienen, wurde zunächst mit Hilfe von in-situ-Hybridisierungen geprüft, ob eine Transkription im Mesoderm während der Myogenese-relevanten Stadien stattfindet. Während Crk in den Stadien 10 bis 14 ubiquitär im Embryo verteilt erscheint (Galletta et al., 1999, eigene Daten ohne Abbildung), konnte für Pk17E keine Transkription in Embryonalstadien nachgewiesen werden. Eine in Bezug auf die embryonale Myoblastenfusion relevante Interaktion von Pk17E und Blown fuse ist daher unwahrscheinlich. Da in dem genannten Hefe-Screen jedoch nicht nur embryonale Faktoren getestet wurden, könnte eine Interaktion mit Pk17E zum späteren Zeitpunkt, z.B. während der larvalen Stadien oder im Adultus, eine Rolle spielen. Die Interaktion von Crk und Blown fuse könnte dagegen in der Tat während der Myogenese stattfinden.

18.2. Evolutionäre Konservierung von Blow

Von funktionalen Mustern, die für eine Protein-Protein-Interaktion essentiell sind, wie z.B. globalen Domänen oder Phosphorylierungsstellen, zu erwarten ist, dass sie hochkonserviert sind. Daher wurde überprüft, ob Blown fuse auch in anderen Spezies existiert und ob sich dort einige der unter 18.1 beschriebenen putativen Phosphorylierungsstellen oder Bindemotive wiederfinden lassen. Diese konservierten Motive sollen dann zur Bildung einer ersten Arbeitshypothese über die Funktion und das Zusammenspiel von Blown fuse mit anderen Proteinen in den engeren Interessenskreis gezogen werden.

Um mögliche Orthologe zu Blown fuse zu finden, wurden zunächst die gängigen Fliegen-Datenbanken Flybase (Grumbling et al., 2006) und FlyMine (www.flymine.org) durchsucht und schließlich ein heuristischer Datenbankvergleich mit dem Basic Local Alignment Search Tool (Blast) (Altschul et al., 1990) durchgeführt, in dem die Sequenz der PH-Domäne eingesetzt wurde. Die zur weiteren Auswertung herangezogenen Sequenzvergleiche sind als Alignements im Anhang dargestellt.

18.2.1. Blown fuse in anderen *Drosophila*-Species

Zunächst wurde festgestellt, dass Blown fuse in allen *Drosophila*-Species deren Sequenzen über Datenbanken zugänglich sind in hohem Maße konserviert vorliegt.

Ein globales multiples Alignement unter Verwendung von ClustalW führt beim Vergleich des Proteins der Arten *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, *Drosophila yakuba* (evolutionäre Distanz zu *D. melanogaster* jeweils ca. 5 Mio Jahre) und *Drosophila pseudoobscura* (evolutionäre Distanz zu *D. melanogaster* ca. 25 Mio Jahre) zu einer Proteinidentität von über 90% zwischen den ersten drei genannten Arten und einer Proteinidentität von über 60% zwischen den ersten drei Arten und *Drosophila pseudoobscura*. Dabei ist die PH-Domäne zwischen allen vier Arten über 90% Prozent identisch. Auffällig ist auch die Konservierung der SH3-Domänen-Bindemotive an den Positionen P325 und P360 sowie die Konservierung des SH2-Domänen-Bindemotivs an Position Y342 (Abb. 23.3). Als konserviert erweisen sich ferner die mit möglichen Substratmotiven übereinstimmenden Phosphorylierungsvorhersagen an den Positionen S123, S451, S462, S467, S477, S559, S574, T481, T636 und Y342, wobei nur Vorhersagen berücksichtigt wurden, die sowohl mit der NetPhos-Analyse als auch mit der ELM- und Scansite-Suche in allen vier Sequenzen übereinstimmen.

18.2.2. Das durch ENSANGG00000024571 codierte *Anopheles*-Protein ist ortholog zu Blown fuse.

Ein Datenbankhinweis (FlyMine) und eine Blast-Suche mit Hilfe der Sequenz der PH-Domäne von Blown fuse führten zu dem durch den im Locus ENSANGG00000024571 codierten Protein von *Anopheles gambiae* (evolutionäre Distanz zu *Drosophila* ca. 250 Mio Jahre), das als ortholog zu Blown fuse angesehen wird. Ein Sequenzvergleich durch ein Alignement mit Hilfe einer auf der Wort-Methode basierenden Analyse führt zu einer Identität der Aminosäure-Sequenzen von 29,4 %. Dabei ist die PH-Domäne jedoch deutlich höher, nämlich zu 35,1 %, identisch konserviert. 20 Aminosäuren C-terminal der PH-Domäne findet sich das konservierte SH3-Bindemotive R-K-L-P-L-P-P und davon wiederum 23 Aminosäuren C-terminal entfernt das konservierte Tyrosin-Phosphorylierungs-SH2-Domänen-Bindemotiv I-Y-E-E-P-S. Bei der weiteren Suche in nach Orthologen in Vertebraten wurden jeweils Sequenzvergleiche sowohl mit der Blown fuse-Aminosäuresequenz als auch mit der Aminosäuresequenz des *Anopheles*-Proteins herangezogen.

18.2.3. Blow ist ortholog zu den Wirbeltier-Proteinen Src-kinase-associated-phosphoprotein-of-55kD (SKAP-55/Scap1) und Skap-Hom/Skap-55R/Scap 2

Weitere Datenbankvergleiche lieferten das Wirbeltier-Protein Src-associated-phosphoprotein-of-55kD (Skap55) und sein Paralog Skap-Hom als Orthologe des Blown fuse-Proteins. Beide Proteine sind als Adaptor-Proteine in den Signalweg bei der Immunzellerkennung involviert (Marie-Cardine et al., 1998a und 1998b). Sie verfügen über eine ca. 100 Aminosäuren C-terminal gelegene PH-Domäne, die untereinander völlig und zu Blown fuse 29 % identisch ist. Ähnlich zu Blown fuse folgt 32 Aminosäuren C-terminal der PH-Domäne bei Position Y241 ein Phosphorylierungssignal, das aufgrund des umgebenden Motives I-Y-E-E-L-P-S von verschiedenen SH2-Domänen erkannt werden kann und durch Kinasen der Src-Familie phosphoryliert wird (Simeoni et al., 2004). Eine weitere Tyrosin-Phosphorylierungsstelle ist weiter downstream beschrieben, darüberhinausgehende posttranslationale Modifizierungen sind nicht bekannt. Im Unterschied zu Blown fuse und seinem orthologen Protein aus *Anopheles* verfügen die Skap-Proteine über eine C-terminale SH3-Domäne, die in der T-Zell-Synapse die Wechselwirkung mit ADAP (adhesion-and-degranulation-promoting-adaptor-protein) organisiert (Übersichtsartikel: Kennedy et al., 2003). Ein Vergleich der Skap-55- und Skap-Hom Proteine aus verschiedenen Wirbeltieren liefert zwischen 46 % und 82 % Sequenzidentität, wobei in allen Fällen das C-terminal der PH-Domäne beschriebene I-Y-E-E-L-P-S Motiv konserviert ist. Eine Einordnung des *Anopheles*-Proteins in diese Familie und daraus folgend auch die Einordnung von Blow erscheint auch vor dem Hintergrund der großen evolutionären Distanz zwischen den Dipteren und Wirbeltieren (die evolutionäre Distanz zwischen *Drosophila* und den Vertebraten beträgt ca. 830 Mio Jahre) logisch, da die Sequenzidentität des *Anopheles* Proteins mit den Skap-Hom Proteinen aus *Danio rerio* und *Gallus gallus* bei 50,6 % bzw. 47,8 % liegt.

18.2.4. Ektopische Expression des Proteins Scap2/Skap-Hom/Skap-55R in der *twist*-Domäne verursacht Störungen bei der Bildung der Muskulatur, ist aber nicht in der Lage, den *blown fuse*-Phänotyp zu retten

Um zu prüfen, wie stark die funktionale Übereinstimmung zwischen Blown fuse und den Skap55 bzw. Skap-Hom-Proteinen der Wirbeltiere ist, wurde der ORF des Zebra-

fisch (*Danio rerio*)-Gens *scap2* mit Hilfe der Restriktionsenzyme NotI und BamHI in den P-Element-Transformations-Vektor pUAS_t kloniert. Dabei fiel die Wahl auf diesen ORF, da zum einen die durch ihn codierte PH-Domäne die höchste Ähnlichkeit zur PH-Domäne von Blown fuse hat und da zum anderen Scap2/Skap-Hom/Skap-55R aufgrund seines längeren N-terminal der PH-Domäne gelegenen Bereiches in allen Vergleichen eine geringfügig größere Ähnlichkeit zu Blow hat als Skap-55/Scap1. Nach der Etablierung transgener Fliegen wurde das Protein sowohl im Wildtyp als auch im *blow*-mutanten Hintergrund mit Hilfe des *twist*-Gal4-Treibers TGX ektopisch exprimiert. Dies führte in ersten Experimenten im Wildtyp zu starken Unordnungen der somatischen Muskeln, was die prinzipielle Funktionalität des Proteins anzeigt. Es konnte jedoch keine Rettung des *blown fuse*-Phänotyps beobachtet werden. Dies sollte mit Hilfe weiterer Treiber-Linien verifiziert werden.

18.3. Wird Blow phosphoryliert?

Um festzustellen, ob Blown fuse in der Tat durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert wird, wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen sollte nach *in-vitro* Transkription und Translation der *blow*-cDNA getestet werden, ob es im Vorhandensein einer aktivierten Form der Abelson-Kinase zu einer Phosphorylierung kommt. Zum anderen sollte Blown fuse aus Proteinextrakten von Embryonen der Stadien 10 bis 16 isoliert und mit Hilfe von 1D bzw. 2D-Gelelektrophorese und anschließender Maldi-Tof-Analyse festgestellt werden, ob, wie oft und an welchen Positionen Blown fuse phosphoryliert wird. Da für die Position Y342 durch Scansite eine Phosphorylierung durch die Abelson-Kinase als wahrscheinlicher vorhergesagt wird als durch eine Src-Kinase, und da das vorhandene Motiv I-Y-E-E-P-S als hochspezifisch für erstere gilt (Songyang et al., 1995), wurde in den begonnenen *in-vitro*-Tests zunächst nur die Abelson-Kinase als möglicher Kandidat zur Analyse herangezogen.

18.3.1. *in-vitro*-Phosphorylierungstest

Zur *in-vitro*-Überprüfung einer möglichen Phosphorylierung von Blown fuse wurden folgende Peptide mit Hilfe des TNT-Systems exprimiert:

- Blown fuse: Komplette Blown fuse cDNA

- Abl Δ C: cDNA-Fragment der Abelsonkinase, das die SH2, SH3 und Tyrosinkinase-Domäne enthält, jedoch nicht den selbstinhibitorischen C-Terminus. Es handelt sich also um eine aktivierte Form der Kinase.
- Abi: Komplette cDNA des Abelson-interacting-protein. Hierbei handelt es sich um eine Positivkontrolle für die Aktivität der Kinase, da bekannt ist, dass Abi durch Abl phosphoryliert wird.
- Blow Δ N: Da der N-Terminus möglicherweise eine spezifische Reaktion mediert und darüberhinaus eine der beiden putativen Tyrosin-Phosphorylierungs-Stellen enthält, sollte geprüft werden, ob er für eine putative Phosphorylierung essentiell ist. Diesem Konstrukt fehlt daher der N-terminale Bereich.
- Blow Δ N-Y342H (kurz Y342H): Mit Hilfe positionsspezifischer Punktmutagenese wurde zusätzlich die als höchstwahrscheinlich phosphorylierte Aminosäure Tyrosin gegen die Aminosäure Histidin ausgetauscht. Dieses Peptid sollte also nicht Tyrosin-phosphoryliert werden.

Um kontrollieren zu können, ob die gewünschten Peptide in der Tat synthetisiert werden, wurde im TNT®-Ansatz eine tRNA verwendet, die biotinyliertes Lysin einbaut. Der Nachweis erfolgte auf dem Western-Blot mit Hilfe des Vectastain-ABC-Elite-Kits (Abb. 18.2, B: Blow wird exprimiert, es kommt jedoch zur Proteindegradation). Folgende Ansätze für den *in-vitro*-Test wurden mit Hilfe eines Western-Blots und immunhistochemischen Nachweises von phosphoryliertem Tyrosin ausgewertet:

- Abl Δ C und Blow Δ N: Falls Blow durch die Abelson-Kinase phosphoryliert wird, sollte hier ein Signal nachweisbar sein.
- Abl Δ C und Abi: Positiv Kontrolle für die Aktivität der Kinase.
- Abl Δ C, Abi und Blow: Falls Abi trotz aktiver Form der Abelsonkinase als Co-Faktor benötigt wird, sollte hier, jedoch nicht in Spur 1, ein Signal nachweisbar sein.
- Abl Δ C und Y342H: Sofern die Position Y342 essentiell für die Wechselwirkung mit der Abelson-Kinase und die Phosphorylierung von Blow ist, sollte hier kein Signal erscheinen.
- Blow: Negativkontrolle. Es sollte kein Signal nachweisbar sein.

Es erwies sich jedoch, dass die gewählte Nachweis-Methode nicht sensitiv genug ist, denn es werden neben möglicherweise auftretenden Phosphorylierungen der eingesetzten Peptide zahlreiche Tyrosin-Phosphorylierungen der im Kaninchenretikulozyten-Lysat vorhandenen Proteine detektiert (Abb. 18.2, C). Dadurch ist eine Aussage über den Phosphorylierungszustand von Blow nicht möglich.

18.3.2. *in-vivo*-Ansatz zur Klärung der Frage nach der putativen Phosphorylierung von Blow

Auch der *in-vivo*-Ansatz führte nicht zu einer definitiven Aussage über den Phosphorylierungszustand von Blow. Da nach der Auswertung der ersten 2D-Gele schnell klar wurde, dass der Anteil des Proteins im Total-Extrakt sehr gering ist

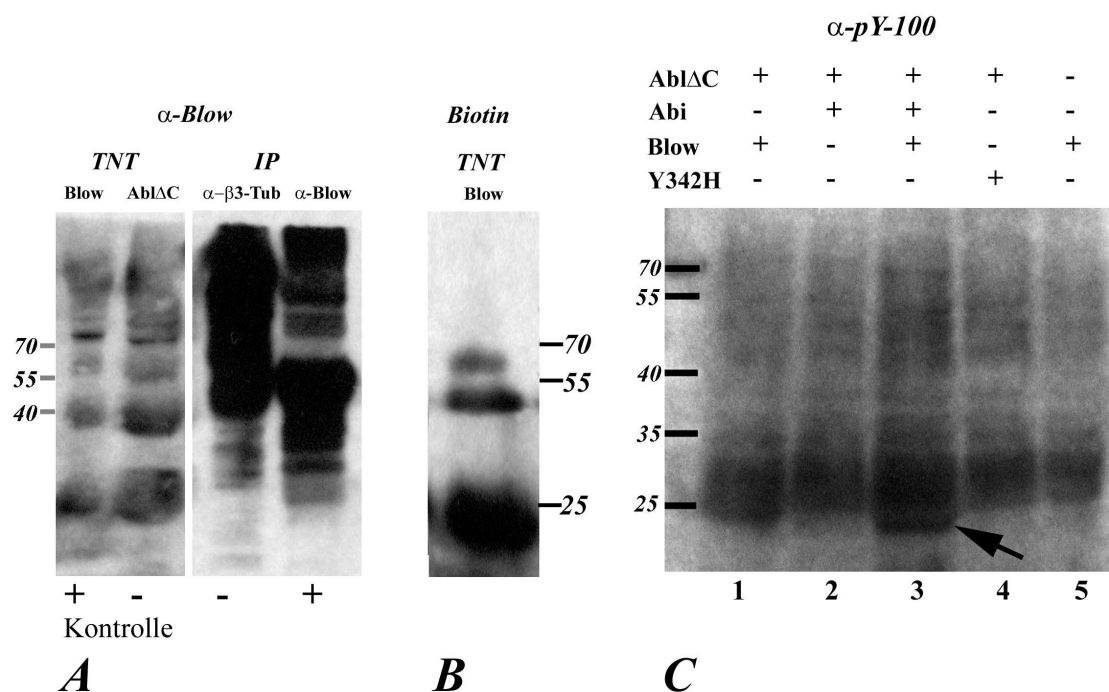


Abbildung 18.2.: Für einen *in-vitro*-Nachweis des Blow-Proteins ist die Spezifität des Antikörpers nicht ausreichend: **A** *in-vitro*-Test des Blow-fuse Antikörpers. Western-Blot, α -Blow. Spur 1: Positivkontrolle - *in-vitro*-exprimiertes Blow-fuse Protein. Spur 2: Negativkontrolle - *in-vitro*-exprimierte aktivierte Abelson-Kinase. Spur 3: Negativkontrolle: Immunpräzipitat mit Hilfe des β 3-Tubulin-Antikörpers, Spur 4: Positivkontrolle: Immunpräzipitat mit Hilfe des α -Blow-fuse-Antikörpers. **B** Test der eingesetzten *in-vitro*-positiv-Kontrolle. Western-Blot, Biotin-Nachweis mit Hilfe des Vectastain-ABC-Elite-Kits, Blow-fuse wird *in-vitro* exprimiert und sollte in **A** deutlich nachweisbar sein. **C** *in-vitro*-Phosphorylierungstest. Western-Blot, α -Phosphotyrosin. Spur 1: Abl Δ C, Blow Δ N, Spur 2: Positivkontrolle, Abl Δ C und Abi, Spur 3: Abl Δ C, Abi und Blow, Spur 4: Abl Δ C, Y342H, Spur 5: Negativkontrolle: Blow. Es werden offensichtlich viele Proteine des verwendeten Kaninchen-Retikulozyten-Lyses erkannt, die das eigentliche Test-Ergebniss verdecken und unauswertbar machen.

wurden zur Anreicherung des Proteins in den aus Embryonen der Stadien 10 bis 13 gewonnenen Protein-Extrakten wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Das gewonnene Präzipitat wurde auf einem präparativen 1D-Gel aufgetrennt und alle mit Hilfe einer Coomassie-Färbung detektierbaren Banden mit Hilfe von Maldi-Tof-Analysen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es sich bei keiner der untersuchten Präzipitat-Proben um eine Anreicherung des gewünschten Proteins handelte, stattdessen wurden vorwiegend Dotterproteine (Vitellogenin II) und Teile des ribosomalen Apparates identifiziert. Eine Kontrolle des Antikörpers mit Hilfe von *in-vitro* exprimierten Peptiden und einer mit Hilfe des β 3-Tubulin durchgeführten Immunpräzipitation zeigte dann, dass der Anteil unspezifisch durch den Antikörper erkannter Proteine so hoch ist, dass eine weitere Analyse des Proteins Blown fuse auf diesem Weg nicht möglich ist (Abb. 18.2, A).

19. Suche nach SH2- und SH3-Domänen enthaltenden Proteinen, cytoplasmatischen Kinasen und Co-Faktoren, die an der putativen Phosphorylierung von Blown beteiligt sein können

Nachdem es wahrscheinlich erscheint, dass Blown fuse mit SH2- bzw. SH3-Domänen enthaltenden Proteinen wechselwirken kann, speziell vermutlich mit dem SH2-SH3-Adaptor-Protein Crk, wurde überprüft, ob ein Ausfall von *crk* im somatischen Mesoderm zu einem Defekt bei der Bildung der somatischen Muskeln führt.

Da es zudem wahrscheinlich erscheint, dass Blown fuse durch Tyrosin-Phosphorylierung in seiner Funktion reguliert wird, wurden verschiedene cytoplasmatische Tyrosin-Kinasen hinsichtlich eines somatischen Muskelphänotypes in Funktionsverlustmutanten untersucht. Schließlich wurden ergänzend einige Faktoren, von denen aus der Literatur bekannt war, dass sie als Substrate bzw. aktivierende oder hemmende Faktoren für eine der untersuchten Kinasen wirken (Übersichtsartikel: Hantschel und Superti-Furga, 2004), ebenfalls in Bezug auf ihr Expressionsmuster bzw. mögliche Defekte bei der Myogenese analysiert.

19.1. Ein verringerter *crk*-mRNA-Level im somatischen Mesoderm verursacht ein gestörtes Muskelmuster, begleitet von unfusionierte Myoblasten

Da das Gen *crk* auf dem vierten Chromosom von *Drosophila* lokalisiert ist und keine herkömmlichen Mutanten zur Verfügung stehen, wurde zur Analyse eines möglichen durch den Ausfall von *crk* verursachten Muskelphänotyps versucht, mit Hilfe einer anti-sense RNA, den Protein-Level unter eine funktionale Dosis zu senken.

19.1.1. Herstellung eines *crk*-knockdown-Konstruktes

Es wurde zunächst mit Hilfe der Primer Crkisfor und Crkisrev per PCR ein 578bp großes Fragment der Crk-cDNA amplifiziert, wobei der DGCR-Klon LD0827 als Template verwendet wurde. Das Produkt wurde in pCR-TOPO-II zwischenkloniert. Als Zielvektor diente der Klon314, der als Derivat des Vektors pCaSpeR3-

UAS (pUAS_t) 2001 von Simone Lier zur RNAi-Analyse des Gens *alien* generiert wurde (Simone Lier, mündliche Mitteilung). Zur Erzeugung von doppelsträngiger RNA enthält dieser Klon zwei die MCS flankierende UAS/Hsp70-Promotoren, die in der Lage sein sollten, das dazwischen klonierte DNA-Fragment sowohl in sense- als auch gleichzeitig in anti-sense-Richtung zu produzieren. Beim Verdau mit EcoRI entfällt jedoch einer der beiden UAS/Hsp70-Promotoren, so dass nach unge richteter Klonierung des Crk-Fragmentes über EcoRI und anschließender Analyse der Orientierung folgendes Konstrukt entsteht: Downstream des verbleibenden UAS/Hsp70-Promotors ist das Crk-Fragment in anti-sense-Richtung orientiert, so dass bei Aktivierung des UAS/Hsp70-Promotors eine Crk-anti-sense-RNA transkribiert wird. Es wird erhofft, dass durch ektopische Expression dieses Konstruktes der Level der intrinsischen Crk-sense-mRNA im Zielgewebe soweit gesenkt werden kann, dass phänotypisch beobachtbare Effekte entstehen.

Nach der Injektion in *white*⁻-Fliegen wurden drei unabhängige transgene Linien etabliert. Zur Transkription des RNA-knockdown-Konstruktes wurde die Linie 341Crk-5a verwendet, da hier vermutlich multiple Integrationen ins Genom vorliegen und so möglichst vermieden werden soll, dass ein ungesättigter Überschuss an Gal4 entsteht.

19.1.2. Knockdown von *crk* im somatischen Mesoderm

Da *crk* während der Stadien 10 bis 14 ubiquitär im Mesoderm transkribiert wird, wurde zunächst ein *twist*-Gal4-Treiber eingesetzt, um das generierte knockdown-Konstrukt im Mesoderm transgener Fliegen zu aktivieren. Mit Hilfe eines immunhistologischen β 3-Tubulin-Nachweises wurde beobachtet, dass die somatischen Muskeln der erhaltenen Embryonen deutlich dünner als im Wildtyp erscheinen. Teilweise entsteht der Eindruck, dass Lücken im Gesamtmuster vorhanden sind (Abb. 19.1, A, Pfeil). Vor allem im dorsalen Bereich, in dem Twist am stärksten Exprimiert wird, sind häufig unfusionierte Myoblasten zu finden (Abb. 19.1, C, Pfeile). Jedoch weisen die gebildeten Muskeln deutlich mehr als drei Kerne auf (Abb. 19.1, C, Pfeilköpfe). Es fällt ins Auge, dass die unfusionierten Myoblasten eine bemerkenswerte Größe im Vergleich zu normalen Wildtyp-Myoblasten besitzen. Die Ursache dafür bleibt noch zu klären. Erstaunlicherweise wurde der beobachtete Phänotyp deutlich verstärkt, wenn an Stelle des *twist*-Gal4-Treiber der in den Founder-Zellen aktive rP298-Gal4-Treiber verwendet wurde (Abb. 19.1, B, D). Dabei erscheinen

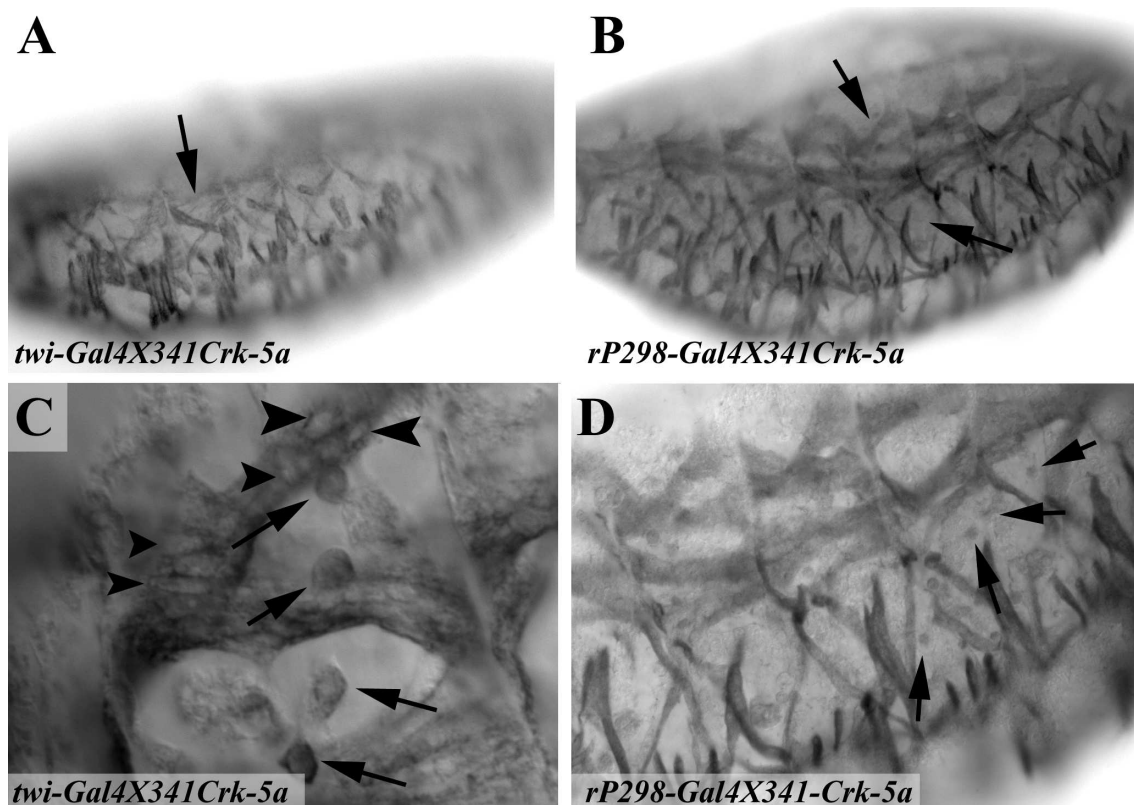


Abbildung 19.1.: Knockdown von Crk im somatischen Mesoderm: **A, C** Knockdown in der *twist*-Domäne. **B, D** Knockdown in Founder-Zellen. **A** Das Muster der somatischen Muskeln ist unregelmäßig und weist Lücken (Pfeile) auf. **C** Es treten vor allem im Bereich der Dorsalen Muskeln unfusionierte Myoblasten auf (Pfeile). **B** Das Muskelmuster erscheint stärker gestört als beim Knockdown in der *twist*-Domäne (Pfeil). **D** Die Zahl der unfusionierten Myoblasten erscheint höher als beim Knockdown in der *twist*-Domäne (Pfeile in D).

sowohl die Lücken im Muskelmuster größer und die Muskel teilweise sogar desorientiert (Abb. 19.1, B, Pfeil), als auch die Anzahl der unfusionierten Myoblasten insgesamt größer (Abb. 19.1, D, Pfeile). Dies Ursachen dafür dürften eine stärkere und zeitlich näher an der Myoblasten-fusion liegende Expression des Konstruktes durch den rP298-Gal4-Treiber im Verhältnis zum *twist*-Gal4-Treiber sein. Ferner ist bekannt, dass der rP298-Gal4-Treiber in der Lage ist, durch die Expression von Gal4 selbst einen schwachen Fusionsphänotyp zu verursachen, der allerdings im oben beschriebenen Experiment verstärkt erscheint (Kreisköther, mündliche Mitteilung, Daten nicht gezeigt). Weiterführende Experimente sollten daher unbedingt die Expression des generierten Konstruktes mit Hilfe weiterer spezifischer Treiber, wie z.B. *rols*-Gal4 oder *sns*-Gal4 einschließen.

19.2. Phänotyp-Analysen an Mutationen in Genen, die für möglicherweise an der Phosphorylierung von Blow beteiligte zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen codieren

Als Kandidaten für eine putative Tyrosin-Phosphorylierung von Blow wurden hier die Kinasen der Src-Familie Src42A, Src64B, die Tec-Kinase Btk29A, sowie die Abelson-Kinase analysiert. Von allen vier Kinase-Genen ist bekannt, dass sie einen hohen Anteil maternal beigesteuerter mRNA codieren. Die Kinasen der Src-Familie können darüberhinaus untereinander redundant wirken, vor allem bei Src42A und Btk29A ist dies bei *Drosophila* der Fall (Übersichtsartikel: Hantschel und Superti-Furga, 2004).

19.2.1. *Src42A*-mutante Embryonen zeigen teilweise unfusionierte Myoblasten, haben jedoch keinen primären Fusionsdefekt

Zur Analyse des somatischen Mesoderms in Src42A-Funktionsverlustmutanten wurde das durch EMS-Mutagenese erzeugte lethal rezessive Allel *Src42A^{myri}* herangezogen, in dem eine Mutation der inhärenten Myristoylierungs-Stelle vorliegt. Im Stadium 15 bis 16 sind im dorsalen Bereich starke Defekte in Bezug auf die Ordnung der Muskulatur (Abb. 19.2, A) zu beobachten, die stellenweise von unfusionierten Myoblasten begleitet werden (Abb. 19.2, A, Pfeile). Dagegen sind in den meisten *Src42A*-mutanten Embryonen die lateralen und ventralen Muskeln nur selten von Defekten betroffen (Abb. 19.2, B). Dies legt nahe, dass es sich bei den beobachteten Muskeldefekten um aus dem fehlerhaften Dorsalschluss resultierende Sekundäreffekte und nicht um echte Myoblasten-Fusions-Defekte handelt.

19.2.2. *Btk*-mutante Embryonen zeigen starke Beeinträchtigungen beim Dorsalschluss

Bei der Analyse des durch P-Element-Insertion entstandenen Allels *Btk29A^{k00206}* wurden ähnliche Beobachtungen wie bei der Analyse von Src42A-Funktionsverlustmutanten gemacht: Es zeigen sich zum Teil dramatische Defekte im Dorsalbereich, die mit fehlenden und fehlpositionierten Muskeln sowie unfusionierten Myoblasten auffallen (Abb. 19.2, C). Im lateralen und ventralen Bereich der Embryonen sind die Muskeln dagegen gut ausgebildet und korrekt positioniert. Defekte im Ventralbereich werden offensichtlich durch fehlende Substanz im ZNS-Bereich verursacht (Abb.

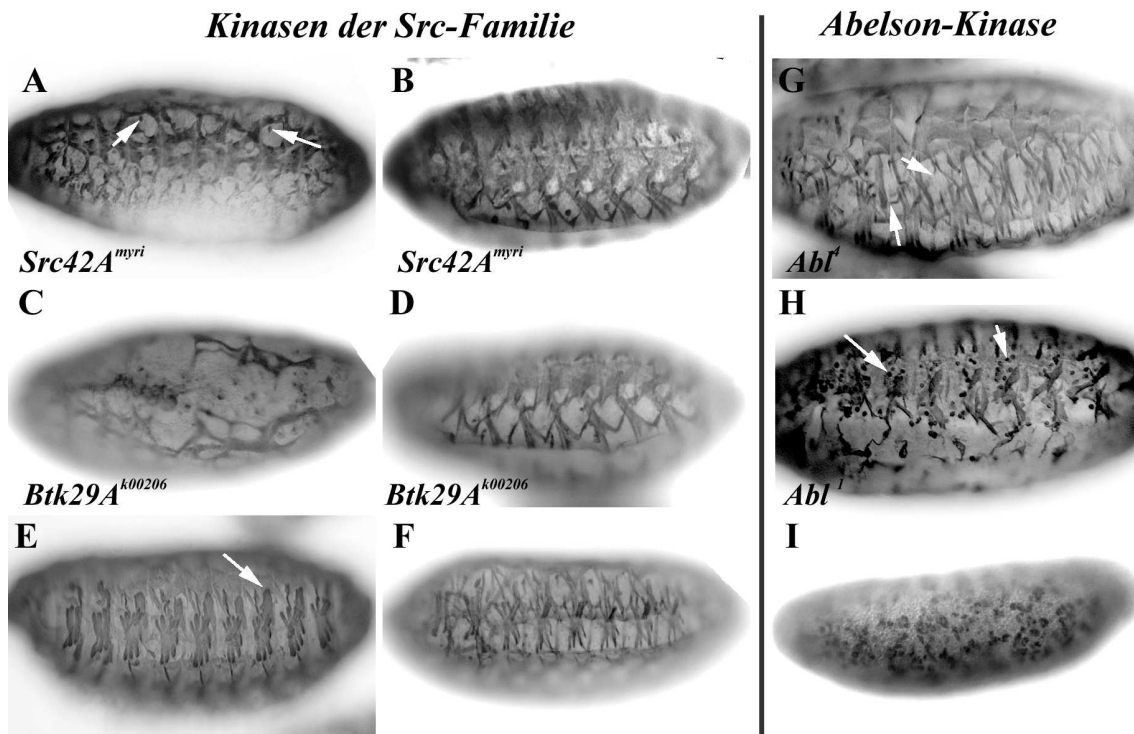


Abbildung 19.2.: Phänotyp-Analyse verschiedener Mutationen in Genen, die für zytoplasmatischer Tyrosin-Kinasen codieren: A-I Immunhistochemischer Nachweis von $\beta 3$ -Tubulin. **A** *Src42A^{myri}*-mutanter Embryo mit deutlichen Defekten im Bereich der dorsalen Muskeln und Dorsalschlussdefekt, Pfeile deuten auf einzelne unfusionierte Myoblasten. **B** *Src42A^{myri}*-mutanter Embryo mit weniger stark gestörten lateralen und ventralen somatischen Muskeln. **C** *Btk29A^{k00206}*-mutanter Embryo mit drastischen Defekten beim Dorsalschluss und im Bereich der dorsalen Muskeln **D** *Btk29A^{k00206}*-mutanter Embryo mit nur wenig gestörten ventralen Muskeln. Durch Defekte des ZNS entsteht eine ventrale Furche. **E** *Src64B*-mutanter Embryo mit regelmäßig geordneten jedoch an den Enden abgerundeten (Pfeil) somatischen Muskeln. **F** *Btk29A-Src42A*-doppelmutanter Embryo. Die Muskeln erscheinen dünner als im Wildtyp sind jedoch korrekt angeordnet und es liegen keine offensichtlichen Fusionsfehler vor. **G** *Abl^l*-mutanter Embryo. Die Muskeln erscheinen dünner und weniger regelmäßig geordnet als im Wildtyp. **H** *Abl^l*-mutanter Embryo. Neben den dünneren und weniger regelmäßig geordneten Muskeln treten häufig unfusionierte Myoblasten (Pfeil) auf. **I** *twi-Gal4* \times *UAS-Bcr:Abl*. Die Expression des Chimärenproteins Bcr:Abl in der twist-Domäne führt zu starken Mesoderm-Defekten in der frühen Entwicklung.

19.2, D). Auch hier liegen aus dem Dorsalschlussdefekt resultierende Sekundäreffekte in Bezug auf die Bildung der Muskeln nahe. Dies sollte unter zu Hilfenahme der Expressionsmuster von Eve oder Krüppel in der Zukunft überprüft werden.

19.2.3. *Src64B*-mutante Embryonen zeigen keinen Muskelphänotyp

Der Analyse der Kinase Src64B liegt das durch P-Element-Insertion generierte Allel *Src64B^{UY1332}* zugrunde. Abgesehen von deutlich runden Muskelenden, die auf Fehler bei der Muskelanheftung hinweisen, konnten keine Defekte beobachtet werden (Abb. 19.2, E, Pfeil = runde Muskelenden). Die Aktivierung des P-Elementes über interne UAS-Stellen mit Hilfe von *twist*-Gal4 lieferte widersprüchliche Ergebnisse und sollte gegebenenfalls mit Hilfe eines spezifischeren Gal4-Treibers wiederholt werden.

19.2.4. *Src42A-Btk*-Doppelmutanten haben keinen primären Fusionsdefekt

Da bekannt ist, dass Src42A und Btk29A redundant wirken, wurden Doppelmutanten hinsichtlich ihres Muskelphänotyps analysiert. Auch hier wurden zwar dünnere und leicht fehlorientierte Muskeln im lateralen und ventralen Bereich der Embryonen beobachtet, es kann jedoch kein typischer Fusionsdefekt festgestellt werden, der durch unfusionierte Myoblasten angezeigt würde (Abb. 19.2, F). Es wird also geschlossen, dass entweder eine weitere redundante Src-Kinase an der Myoblasten-Fusion beteiligt ist, oder dass die Src-Kinasen keinen Einfluss auf diesen Prozess haben.

19.2.5. *Abl⁴*-mutante Embryonen haben dünne und teilweise fehlgeleitete Muskeln, aber keine unfusionierten Myoblasten

Bereits 1992 wurde von Bennett und Hoffman ein Effekt von Abl-Funktionsverlust-mutanten auf das embryonale Muskelmuster beschrieben. Während die genannten Autoren jedoch Doppelmutanten der Gene *abl* und *disabled* (*dab*) analysierten, konnte hier beobachtet werden, dass das homozygote Vorliegen des hypomorphen Funktionsverlust-Allels *Abl⁴* bereits die beschriebenen dünnen und fehlgeleiteten Muskelenden provoziert (Abb. 19.2, G, Pfeil fehlgeleitete Muskelenden). Es sind jedoch keine unfusionierten Myoblasten zu erkennen.

19.2.6. *Abl¹*-mutante Embryonen zeigen dünne Muskeln und viele unfusionierte Myoblasten

Bei der Analyse des als hypomorph beschriebenen Allels *Abl¹* werden wie auch bei der Analyse des Allels *Abl⁴* dünne und fehlgeleitete Muskeln beobachtet. Daneben zeichnet sich diese Mutation jedoch durch eine Anzahl unfusionierter Myoblasten aus

(Abb. 19.2, H, Pfeile). Da kein zu den Src-Kinasen vergleichbarer Dorsalschlussdefekt festgestellt werden konnte, ist dies ein deutlicher Hinweis auf die Beteiligung der Abelson-Kinase an der somatischen Myoblasten-Fusion.

19.2.7. Ektopische Expression eines Bcr:Abl-Chimären-Proteins in der *twist*-Domäne führt zu starken Defekten im frühen Mesoderm

Es ist zu vermuten, dass durch die vorhandene starke maternale *Abl*-mRNA-Komponente ein möglicherweise früher eintretender deutlicherer Fusionsdefekt in *Abl*-mutanten Embryonen verdeckt wird. In Mäusen, die an der Chronischen Myelogenen Leukämie (CML) leiden, existiert jedoch eine deregulierte, onkogene Form der Abelson-Kinase, das BCR:Abl-Fusionsprotein P210, welches hier ausgenutzt werden soll, um mögliche Einflüsse der Kinase auf das frühe Mesoderm aufzudecken. Ein ektopisch im Nervensystem von *Drosophila* exprimiertes Chimären-Protein, das aus dem 5'-Bereich des humanen Onkogens BCR:Abl und dem 3'-Bereich der *Drosophila*-Abelsonkinase zusammengesetzt ist, ist in der Lage starke Phänotypen zu provozieren (Fogerty et al., 1999). Die Expression dieses Chimären-Proteins mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems unter Verwendung eines *twist*-Gal4 Treibers führt im Mesoderm von *Drosophila* Embryonen zu schweren Defekten (Abb. 19.2, I). Dabei liegen die Ursachen vermutlich bereits während der Migration des Mesoderms begründet und es bleibt zunächst zu prüfen, ob die vorhandenen β 3-Tubulin-positiven Zellen bereits determinierte oder naive Myoblasten sind. Eine Überprüfung mit geeigneten Founder-Zellmarkern bzw. Markern für die fusionskompetenten Myoblasten, wie z.B. dem Transkriptionsfaktor Lameduck, könnte hier in der Zukunft Klarheit liefern.

19.3. Suche nach weiteren im Kontext von Blow und den untersuchten Tyrosin-Kinasen an der Myogenese beteiligten Komponenten

Da für die Abelson-Kinase, aber auch für die Kinasen der Src-Familie ein ganzes Orchester von situationsabhängig mehr oder weniger essentiellen und spezifischen Substraten, Aktivatoren und Repressoren bekannt ist, wurde damit begonnen, diese in die Frage nach einer Beteiligung an der mesodermalen Funktion von Blown fuse mit einzubeziehen.

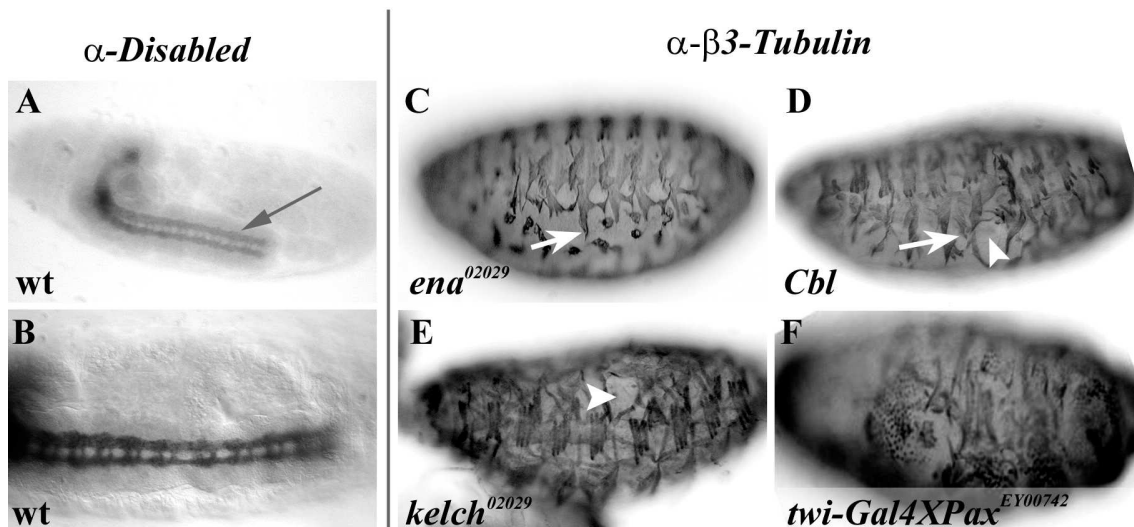


Abbildung 19.3.: Suche nach weiteren im Kontext von Blow und den untersuchten Tyrosin-Kinasen an der Myogenese beteiligten Komponenten: A-B Immunhistologischer Nachweis von Disabled: Die Expression des Proteins während der Embryonalentwicklung ist auf das Zentrale Nervensystem (= Pfeil in A) beschränkt. A ventrolaterale Ansicht. B ventrale Ansicht. C-D Immunhistologischer Nachweis von β 3-Tubulin. C *ena*⁰²⁰²⁹-mutanter Embryo, D *Cbl*-mutanter Embryo. E *kelch*-mutanter Embryo. C-E Es sind keine Fusionsdefekte jedoch gelegentlich Fehlordnungen der Muskulatur (Pfeile) zu beobachten. C *ena*-mutante Embryonen zeigen deutlich massivere Muskeln als Wildtyp-Embryonen. F Aktivierung eines P-Elementes in der putativen Promotor-Region von *paxillin* durch *twist*-Gal4 führt zu drastischen Defekten.

19.3.1. Disabled wird nicht im embryonalen Mesoderm exprimiert, sondern ist auf das ZNS beschränkt

Da Bennett und Hoffmann (1992) für *abl-dab*-Doppelmutanten einen Phänotyp beschreiben konnten, wurde zunächst geprüft, ob Disabled einen Einfluss auf die somatische Myogenese hat. Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörpers wurde ein immunhistologischer Nachweis durchgeführt. Dieser zeigte, dass Disabled während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* nicht im Mesoderm exprimiert wird, sondern auf das Zentrale Nervensystem beschränkt ist (Abb. 19.3, Pfeil in A = ZNS, B). Da es sich soweit bekannt ist nicht um einen sekretorischen Faktor handelt, wird eine direkte Beteiligung an der Fusion der Myoblasten ausgeschlossen.

19.3.2. *Cbl*, *enabled*, und *kelch*-mutante Embryonen zeigen keine Fusionsdefekte

Während von *Cbl* und *Enabled* (*Ena*) bekannt ist, dass sie Substrate der Abelson-Kinase sind, handelt es sich bei *Kelch* um einen aktivierenden Faktor für die Kinase *Src64B*. Mit Hilfe von immunhistologischen Nachweisen von β 3-Tubulin wurde in Embryonen, die jeweils für einen der drei Faktoren homozygot mutant waren, untersucht, ob eine Störung der Muskulatur erkennbar ist. In allen drei Fällen konnten stellenweise Fehlordnungen oder Lücken im somatischen Muskelmuster festgestellt werden (Abb. 19.3, C, D, E, Pfeile weisen auf Lücken). Diese sind in *kelch*-mutanten Embryonen, wie auch in den oben beschriebenen Mutanten für die *Src*-Kinasen, vorwiegend im Dorsalbereich zu finden und weisen auch hier auf Beeinträchtigungen beim Dorsalschluss hin. Es konnte in keiner der untersuchten Mutanten ein signifikantes Auftreten von unfusionierten Myoblasten beobachtet werden. Auffällig ist jedoch in *ena*-mutanten Embryonen, dass eindeutige Anheftungsdefekte vorliegen (Abb. 19.3, C, Pfeil). Dies ist in schwächerer Form auch in *Cbl*-mutanten Embryonen der Fall (Abb. 19.3, D, Pfeil). Es ist jedoch nicht geklärt, ob dieser Defekt seine Ursache in einem fehlerhaften Strecken der Muskeln, einem Orientierungsverlust oder im Unvermögen, den Zell-Zell-Kontakt zu etablieren und zu stabilisieren, begründet ist.

19.3.3. *twist*-Gal4-gesteuerte Aktivierung einer EP-Insertion im putativen Promotor-Bereich von *paxillin* führt zu starken Defekten bei der Entwicklung des somatischen Mesoderms

Ein Substrat für die Kinase *Src42A* ist das LIM-Domänen-Protein *Paxillin*, das nach dem Erhalten eines extrazellulären Signales Phosphoryliert wird und dadurch in Zellkultur die Translokation cytoplasmatische Protein-Komplexe, für die das Protein *Crk* als Anker dient, zu sogenannten Focal Adhesions, bewirken kann (Li et al., 2001 und 2003). Die P-Element-Insertions-Linie *pax*^{EY00742} trägt ein mit Gal4 aktivierbares EP-Element innerhalb des putativen Promotors von *paxillin*. Die Aktivierung dieses Elementes im embryonalen Mesoderm mit Hilfe eines *twist*-Gal4-Treibers führt zu starken Defekten bei der Bildung der Muskulatur (Abb. 19.3, F). Es ist jedoch nicht klar, ob es in den dadurch entstandenen mutanten Embryonen überhaupt zur korrekten und gleichmäßigen Einwanderung des Mesoderms und zum Dorsalschluss kommt, oder ob hier, vergleichbar den *Src*-Kinasen, massive

Sekundärdefekte im Bereich der Muskulatur vorliegen. In weiterführenden Experimenten könnte das hier verwendete P-Element mobilisiert werden und dadurch eine Deletionsmutante generiert werden, die eine genauere Phänotyp-Analyse erlauben könnte.

Teil IV.

Diskussion

20. Die Organisation der Mitteldarm-Muscularis ist angepasst an die Fressgewohnheiten von *Drosophila melanogaster*

Die Hauptaufgabe der Mitteldarm-Muscularis von *Drosophila melanogaster* ist das Pumpen des Chymus durch die Ausführung peristaltischer Bewegungen (Chapman, 1999). Dafür ist zum einen eine hohe Flexibilität, zum anderen aber auch ein verhältnismässig hoher Kraftaufwand der beteiligten Muskeln notwendig. Hinzu kommt, dass auf Grund der interiorenen Lage ein Kraftgewinn durch Massezuwachs nur in begrenztem Umfang sinnvoll möglich ist. Daneben kommt der Mitteldarmmuskulatur die Aufgabe zu, Volumenschwankungen des Darmes, die z.B. durch Fresspausen verursacht werden, auszugleichen und den Darm zu stabilisieren.

20.1. Die Netzform der Ringmuskeln und die Verflechtung mit den Längsmuskeln erlauben große Kraft bei geringer Masse und gewährleisten eine kontinuierliche Stabilisierung des Mitteldarm-Epithels.

In dem oben genannten Zusammenhang scheint die beobachtete Netzform der zirkulären Mitteldarmmuskeln (s. 13.1.1, S. 84) eine optimale Lösung des Kraft/Masse-Problems zu sein. Durch die Aufspaltung der Muskeln in dieser Form entsteht durch die Addition der wirkenden Kräfte eine große Gesamtkraft bei relativ geringer Muskelmasse. Ein zweites Problem, nämlich die Gewährleistung einer gewissen Positionsstabilität der nicht am Darm direkt verankerten Ringmuskeln, wird mittels der Verwebung der Ringmuskeln mit den Längsmuskeln elegant gelöst. Das so entstandene Muskelgeflecht ist optimal dazu geeignet den starken Beanspruchungen durch das sich ständig, wenn auch im geringen Maß, ändernde Volumen des Mitteldarmes zu genügen und um einen fortwährenden Transport des Chymus zu gewährleisten. Ein ähnliches Prinzip von netzförmigen Ringmuskeln, die mit den Längsmuskeln verwoben sind, wird bei den Larven des Tabakswärmers *Manduca sexta* beobachtet (s. 13.1.2). Wie bei den Larven von *Drosophila* handelt es sich hier im Allgemeinen

um kontinuierlich fressende Tiere, die in regelmäßigen Abständen kurze Fresspausen aber keine Hungerphasen einlegen. Auch für die Schabe *Periplaneta americana* ist eine vergleichbare Organisation der Muscularis beschrieben (Nagai und Brown, 1969).

20.2. Bei *Schistocerca* findet die Peristaltik nicht durch die Mitteldarm-Muskeln statt

Auch bei den Larven von *Schistocerca gregaria* ist eine zum größten Teil kontinuierliche Nahrungsaufnahme zu beobachten (Dettner und Petersen, 2003). Daraus resultiert die ebenfalls permanente Notwendigkeit, den Chymus durch den Darm zu befördern. Dies wird hier jedoch nicht durch die Muskeln des Mitteldarmes sondern durch den vorgelagerten Kropf bewerkstelligt (Chapman, 1999). Die beobachteten drei Muskel-Lagen des Mitteldarmes dienen also vorrangig der Stabilisierung des Mitteldarm-Endoderms während der durch Fresspausen auftretenden Volumenschwankungen. Es ist daher kein Kompromiss zwischen Flexibilität und Kraft, wie er bei *Drosophila* beobachtet wurde, notwendig.

20.3. Insekten, deren Darmvolumen durch diskontinuierliche Fressgelegenheiten stark schwankt, zeigen eine weniger starke Verflechtung der Mitteldarm-Muscularis

Bei den Moskito-Fliegen *Aedes aegypti* und *Anopheles gambiae*, die nur bei passender Gelegenheit Nahrung aufnehmen, findet sich eine andere Situation. Dadurch ändert sich das Mitteldarm-Volumen signifikant in Abhängigkeit von Nahrungsaufnahme und -speicherung. Aufgrund dessen muss die Mitteldarm-Muscularis in der Lage sein, große Dehnungen zu erlauben. Dies wäre mit der oben beobachteten engverflochtenen Struktur der netzförmigen Ringmuskeln nicht vereinbar. Die Lösung ist in diesem Fall eine Akkordion-ähnliche Struktur der Ringmuskeln, bei der es zu gemeinsam genutzten Myofibrillen zwischen benachbarten Ringmuskeln kommt (Park und Shahabuddin, 2000).

Auch die Mitteldarm-Muscularis der Sandfliegen *Lutzomyia longipalpis* und *Phlebotomus duboscqi* verfügt über eine hohe Dehnfähigkeit als Anpassung an nur gelegentlich auftretende Möglichkeiten zur Nahrungsaufnahme. Dies wird hier dadurch erreicht, dass die longitudinalen Muskeln stets ausserhalb der zirkulären verlaufen

und so ein Verschieben der zirkulären und longitudinalen Muskeln gegeneinander erleichtern (Secundino et al. 2005).

20.4. Die Organisation der Mitteldarm-Muscularis ist nicht abhängig von der Zugehörigkeit zu einer Systematischen Einheit

Zusammenfassend läßt sich auf Grund der beschriebenen Beobachtungen die Hypothese aufstellen, dass die Organisation der Mitteldarm-Muscularis vom Fressverhalten aber nicht von der systematischen Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe abhängt. So findet sich das bei *Drosophila melanogaster* beobachtete Prinzip der mit den Längsmuskeln verwobenen netzförmigen Ringmuskeln neben den Dipteren, zu denen *Drosophila* gehört, sowohl bei den Lepitoptera (*Manduca sexta*) als auch bei den hemimetabolen Insekten (*Periplaneta americana*). Dagegen weisen mehrere Dipteren, nämlich die Moskitos *Anopheles gambiae* und *Aedes aegypti* sowie die Sandfliegen *Lutzomyia longipalpis* und *Phlebotomus duboscqi*, eine zu *Drosophila* unterschiedliche Organisation der Muscularis auf. Auch bei den hemimetabolen Insekten läßt sich keine einheitliche Organisation beobachten, wenn man z.B. *Periplaneta americana* mit *Schistocerca gregaria* vergleicht.

Aus entwicklungsbiologischer Sicht wäre es in der Zukunft für die betrachteten Arten, die eine ähnliche Muscularis-Struktur wie *Drosophila* besitzen, von Interesse, folgende Fragen zu klären: Erstens, stellen die quergestreiften Ringmuskeln in allen Fällen auch Syncytien dar oder handelt es sich bei den syncytialen viszerale Muskeln von *Drosophila* in dieser Hinsicht um einen Sonderfall? Zweitens, wie läuft eine eventuelle Fusion ab? Drittens, unterscheidet sich das Sarkomer-Assembly der untersuchten Arten? Während die letzte Frage zumindest morphologisch geklärt werden könnte, ist es aufgrund der bislang noch nicht etablierten gentechnischen Werkzeuge schwierig molekularen Faktoren mit Hilfe von z.B. Phänotyp-Analysen auf die Spur zu kommen. Als Einstieg könnte zwar versucht werden, bereits in *Drosophila* charakterisierte Faktoren z.B. mit Hilfe von *in-situ*-Hybridisierung nachzuweisen. Dies setzt aber voraus, dass die entsprechenden Gene im Genom der zu untersuchenden Arten identifiziert werden können.

Auch die Frage nach der Mehrkernigkeit der Muskeln sollte zunächst morphologisch untersucht werden. Aufgrund der geringen Größe der zirkulären Muskeln von

Manduca ist hier jedoch bereits mit technischen Schwierigkeiten bei Untersuchungen im Lichtmikroskop zu rechnen. Ein erster Ansatz zur Klärung dieser Frage, wäre die Injektion von Farbe in bestimmte Muskeln mit deren Hilfe dann bestimmt werden könnte wieviele Kerne diese Muskeln besitzen. Ob Fusionen stattfinden kann dagegen erst geklärt werden, wenn geeignete Marker gefunden wurden, die möglicherweise vorhandene Founder-Zellen oder fusionskompetente Myoblasten darstellbar machen. Darüberhinaus benötigt es einen Versuchsansatz, der z.B. mit der von Klapper et al. (2002) angewandten Transplantationstechnik vergleichbar ist. Dabei ist ein bestimmter Farbnachweis nur möglich, wenn zwei Komponenten, die ursprünglich in zwei verschiedenen Zellen vorlagen, durch die Fusion der Zellen gemischt werden und dadurch den Farbstoff erzeugen. Dies bedingt jedoch wiederum ein gewisses Mass an gentechnischen Werkzeugen, um z.B. die zu verwendenden Zellen eindeutig charakterisieren zu können. Solange dies jedoch nicht möglich ist, wären als Alternative auch mehrkernige Muskeln, die durch Endomitosen entstehen vorstellbar. Dies erscheint für Insekten zugegebenermassen unwahrscheinlich, kommt aber bei Wirbeltieren z.B. bei Kardiomyozyten regelmäßig am Ende der Embryonalentwicklung vor.

21. Morphologische Gegenüberstellung der beiden untersuchten Fusionsmechanismen und die Verwendung von Blow und Kette in beiden

Der im Folgenden auf der Basis der beschriebenen Ergebnisse (13.2-13.3.2, 16.5) durchgeführte Vergleich der somatischen Myoblastenfusion und der Fusion der zirkulären viszeralen Founder-Zellen mit fusionskompetenten Myoblasten, zeigt, dass es sich eindeutig um zwei unterschiedliche Fusionsmechanismen handelt. Dabei erscheint die somatische Myoblastenfusion schon aufgrund der Zweistufigkeit komplexer entwickelt. Bezüglich der Etablierung des Zell-Zell-Kontaktes sind jedoch gewisse Ähnlichkeiten zwischen dem ersten somatischen Fusionsschritt und der im viszeralen Mesoderm beobachteten Fusion festzustellen. Ausserdem lassen sich zwischen den Prozessen des viszeralen und des somatischen Muskelwachstums der entstandenen Syncytien aufgrund der ähnlichen Verwendung von Blown fuse und Kette Parallelen ziehen.

21.1. Die Entwicklung der somatischen Muskeln beinhaltet den zweistufigen Fusionsprozess und das Anheften der Muskeln an die Epidermis

Bereits bei der Beschreibung des Phänotyps von Embryonen, die einen Funktionsverlust des Gens *rolling pebbles* (*rols*) erlitten haben, wurden erste Hinweise auf eine Mehrstufigkeit der somatischen Fusion erhalten (Rau et al., 2001). Dabei stellt sich jedoch die Frage, ob es sich in der Tat um zwei getrennte und nach verschiedenen morphologischen und molekularen Mechanismen ablaufenden Fusionsstufen handelt, oder ob möglicherweise eine Art Zählmechanismus vorliegt, der bei Funktionsverlust von z.B. *rols* nach zwei bis drei Fusionen zum Erliegen kommt. Letzterer könnte von einem molekularen Feedback-Mechanismus abhängig sein, wie er unter anderem gesteuert durch *Rols7* für die Aufrechterhaltung der Expression von *Duf* vorliegt (Menon et al., 2005).

Auf den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten morphologischen Analysen (s. 13.2.2, S. 90) sowie den Phänotyp-Analysen der Funktionsverlustmutanten *blow* und

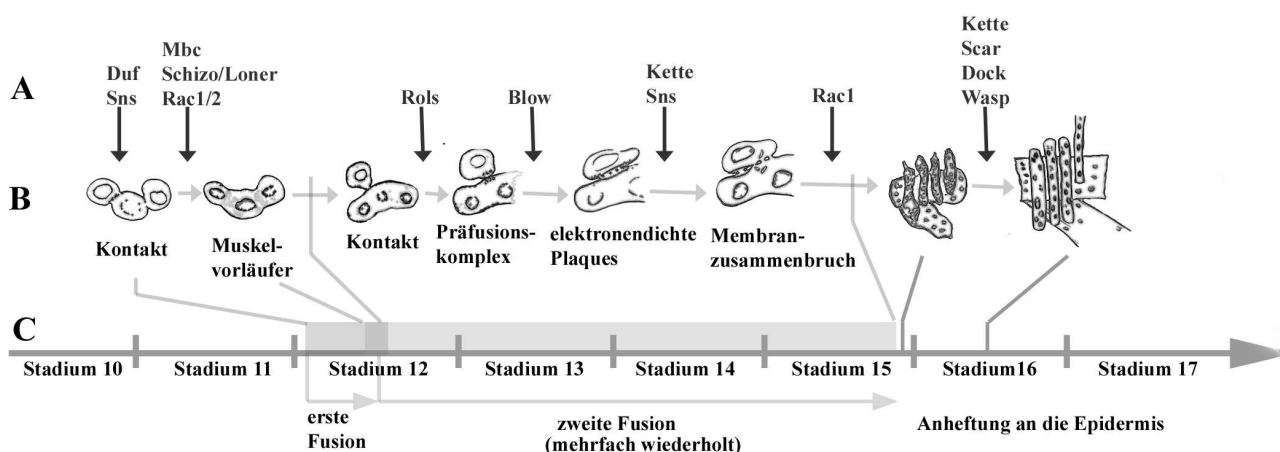


Abbildung 21.1.: **Schema der somatischen Myoblastenfusion** **A** Anhand von mutanten Phänotypen bestimmte Proteinbeteiligung. **B** Schematischer Ablauf der somatischen Myoblastenfusion nach Analyse im TEM. **C** Entwicklungsstadien.

kette (s. 16.5, S. 108-111) gründend, stellt sich die somatische Fusion de facto wie folgt dar (Abb. 21.1): Es finden zwei in ihren ultrastrukturellen Merkmalen unterschiedliche Fusionsschritte statt, so dass auf der deskriptiven morphologischen Ebene definitiv von einem Zweischnitt-Mechanismus ausgegangen werden muss. Im ersten Schritt erfolgt die Bildung des Kontaktes zwischen der jeweiligen Founder-Zelle und den beteiligten fusionskompetenten Myoblasten am Übergang von Stadium 11 zu Stadium 12 und die Fusion zu den dreikernigen Muskelvorläufer-Zellen bis zur Mitte von Stadium 12. Dabei ist zwar eine intensive Kontaktstruktur zwischen der Founder-Zelle und den fusionskompetenten Myoblasten zu beobachten, aber keines der im zweiten Schritt auftretenden typischen ultrastrukturellen Merkmale. Der zweite Schritt der Fusion vom Muskelvorläufer zum vielkernigen Syncytium erfolgt ab der Mitte von Stadium 12 und im großen Umfang im Stadium 13 bis hin zu letzten vereinzelten Fusionen im Stadium 15. Er umfasst eine Vielzahl einzelner Fusionen zwischen fusionskompetenten Myoblasten und der im ersten Schritt gebildeten Muskelvorläufer-Zelle, die als repetitives Muster die Bildung des Präfusionskomplexes aus elektronendichten Vesikeln, dessen Auflösung zu den elektronendichten Plaques und den Membranzusammenbruch beinhalten. Schließlich verankern sich die Muskeln im Stadium 15 und 16 an der Epidermis. Dabei ist zunächst eine gerichtete Streckung der Muskelspitzen zu ihrem Verankerungsziel hin zu beobachten.

21.1.1. Der erste Fusionsschritt erfolgt zwischen unmittelbar benachbarten Zellen und benötigt daher keinen Fusionskomplex

Nach der erfolgreichen asymmetrischen Teilung der Muskelprogenitor-Zellen in zwei spezifische Founder-Zellen erfolgt die erste somatische Fusion jeweils zwischen einer Founder-Zelle und zwei bis drei direkt benachbarten fusionskompetenten Myoblasten. Dies findet in einem Stadium statt, in dem die Founder-Zellen nach der Wanderung an ihre spezifische Position noch in engem Kontakt mit den benachbarten fusionskompetenten Myoblasten stehen, wobei der Zellkontakt über Duf und Sns vermittelt wird. Daher erscheint es nicht notwendig eine zusätzliche Kontaktstruktur wie den im zweiten Schritt beobachteten Fusionskomplex aufzubauen. Stattdessen erinnert die auch im viszerale Mesoderm (s.u.) beobachtete elektronendichte Kontakt-Struktur im TEM eher an eine ausgedehnte Verbindung über Gap Junctions-ähnlichen Strukturen (vgl. Gilula, 1974). Diese könnte durch direkte Kommunikation der Zellen miteinander zum Membranzusammenbruch führen. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass es sich in einem solchen Fall nicht um herkömmliche Gap Junctions handeln kann, da z.B. bis heute keine Beteiligung von Connexin an der Myogenese von *Drosophila* nachgewiesen werden konnte.

21.1.2. Der ultrastrukturelle Feinablauf im zweiten Schritt könnte mit der Fusionskomplex-Theorie korrelieren

Die Theorie über den Aufbau des Fusionskomplexes im somatischen Mesoderm von *Drosophila* (Kesper et al., zur Veröffentlichung eingereicht, vgl. 6.3) geht davon aus, dass es nach einem initialen Kontakt zum Aufbau einer Aktinkern-gestützten Ringstruktur kommt, die in der Folge zur Fusionspore radiär auseinander gezogen wird. Dabei wird postuliert, dass zunächst durch Vesikeltransport Material an die entsprechende Kontaktstelle geliefert wird, aus dem sich eine runde elektronendichte Anheftungsstruktur symmetrisch in beiden Zellen bildet. Diese wird ringförmig auseinander gezogen und im Ringinneren findet der Membranabbau statt. Währenddessen wird an der Aussenseite des Ringes durch Vesikel kontinuierlich Material zum Aufbau der Heftkontakte geliefert. Eine seitliche Ansicht dieses Komplexes würde dann in symmetrischer Anordnung von aussen nach innen zunächst eine Reihe von

Vesikeln gefolgt von einer Plaquesstruktur und schließlich dem Membranzusammenbruch im Zentrum liefern. Dies korreliert zum Teil mit den beobachteten Abläufen im zweiten Schritt der somatischen Fusion (siehe 16.3, S. 111). So wurde zwar beobachtet, dass die elektronendichten Vesikel durch elektronendichte Plaques und schließlich den Membranzusammenbruch abgelöst werden, und es entsteht in verschiedenen untersuchten Querschnitten der Eindruck, dass der Präfusionskomplex dadurch auseinander geschoben wird, es konnte aber keine symmetrische Anordnung der Fusionsmerkmale festgestellt werden. Dies könnte jedoch eine zufällige Ursache in nicht durch den Mittelpunkt des Fusionskomplex gehenden Schnittebenen haben. Zur definitiven Klärung dieses Sachverhaltes bleibt zu zeigen, ob die beschriebene ringförmige Lokalisation von Duf und Sns mit den beobachteten Ultrastrukturen übereinstimmt. Dies ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur mit Hilfe von technisch aufwändigen immunhistologischen Analysen im TEM möglich. Voraussetzung dafür ist, dass hochspezifische, hintergrundfreie Primärantikörper zur Analyse eingesetzt werden können, die darüberhinaus mit einer der gängigen elektronenmikroskopischen Fixierungs-Methoden kompatibel sein müssen. Da die aktuell existierenden Antikörper zwar für lichtmikroskopische Analysen tauglich sind, den genannten elektronenmikroskopischen Ansprüchen aber nicht genügen, sollte ein primäres Ziel weiterführender Arbeiten die Herstellung solcher Antikörper, auch für weitere essentielle Faktoren wie z.B. Blow, Kette und Rols⁷, sein.

21.1.3. Einordnung von Blow und Kette in den Zweistufen-Mechanismus der somatischen Myoblastenfusion

Auf der molekularen Ebene ist die Situation bezüglich eines zweistufigen Fusionsmechanismus differenzierter zu betrachten, da Hinweise auf eine Beteiligung von spezifischen Proteinen an der Myoblastenfusion in der Regel zunächst durch die Analyse von mutanten Phänotypen gewonnen werden. Dabei können jedoch durch verschiedene Effekte Ungenauigkeiten auftreten, indem zum einen starke maternale Komponenten Defekte, die durch den zygotischen Verlust der Gene entstehen, ganz oder teilweise retten und so eine frühe Beteiligung an der Myogenese möglicherweise verdecken. Zum anderen können Beteiligungen an der späten Myogenese durch eine frühe Lethalität, die aus dem Funktionsverlust des jeweiligen Genes resultiert, möglicherweise nicht erkannt werden. Dies ist bei der Aufstellung eines Modells zu

berücksichtigen.

Für *Blown fuse* ist die Situation in Bezug auf die Myoblastenfusion durch die beschriebenen Analysen eindeutig geklärt (Doberstein et al., 1997, diese Arbeit 16.1 und 16.2, S. 108-108). Da keine maternale Komponente vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Defekt, der den zweiten Fusionsschritt betrifft, auch der früheste im somatischen Mesoderm auftretende ist, somit kann *Blow* als nur für den zweiten Fusionsschritt essentiell eingruppiert werden, und zwar für den Übergang vom Präfusionskomplex zu den elektronendichten Plaques. Unklar ist dagegen, ob *Blow* auch an der Anheftung der Muskeln an die Epidermis beteiligt ist. Dies ist naheliegend, da eine starke Expression in den Muskelenden beobachtet wird, kann jedoch nicht anhand eines Funktionsverlust-Phänotyps belegt werden, da hier der Fall eintritt, dass die betroffenen Embryonen bereits in früheren Entwicklungsstadien sterben und so eine Auswertung der Muskelanheftung nicht ohne weiteres möglich ist.

Im Gegensatz dazu liegt ein hoher durch maternale mRNA erzeugter Anteil von *Kette* im Embryo vor (Baumgartner et al., 1995). Zwar konnte hier eindeutig gezeigt werden, dass *Kette* im zweiten Fusionsschritt essentiell ist, und zwar im Zusammenhang mit der Etablierung der elektronendichten Plaques und da niemals wildtypische Plaques beobachtet werden konnten, wird ausgeschlossen, dass der beobachtete Phänotyp durch das fehlerhafte Auseinanderziehen der Plaques entsteht, denn diesem Prozess sollten beobachtbare morphologisch normale Plaques vorausgehen. Es kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass *Kette* auch eine Rolle bei der früher stattfindenden ersten Fusion spielt, die in mutanten Embryonen von der maternalen Komponente übernommen wird. Eindeutig ist jedoch die Beteiligung von *Kette* an der Muskelanheftung, wie die Analyse hypomorpher Allele zeigt.

Die umgekehrte Situation findet sich in Bezug auf die im ersten Fusionsschritt agierenden Proteine *Mbc* und *Schizo/Loner*. Hier ist durch den frühen Phänotyp nicht klar, ob beide - obwohl es naheliegend erscheint - eine Rolle bei der zweiten Fusion spielen. Dagegen zeigt der positive feedback-Mechanismus zwischen *Duf* und *Rols7*, dass *Rols7* nicht zwingend nur im zweiten Fusionsschritt essentiell ist, denn ein die *Duf*-Expression betreffender Dosiseffekt könnte einen Ausfall von *Rols7* während der ersten Fusion kompensieren. Gleichzeitig wird dadurch aber auch eine über die gesamte Myoblastenfusion kontinuierliche Essentialität von *Duf* und *Sns* nachgewie-

sen. Diese wird ansonsten zumindest für Sns nur durch die Analyse von verschiedenen starken Funktionsverlustmutanten bemerkt: Während das Allel *sns*²⁰² als starkes Allel zu einem totalen Verlust der Zelladhäsion und so zu einem Stopp vor der ersten Fusion führt (Bour et al., 2000), akkumulieren in Funktionsverlustmutanten, die das Allel *sns*¹⁵ tragen, elektronendichte Plaques im zweiten Fusionsschritt (Doberstein et al., 1997) - ähnlich wie in *kette*-mutanten Embryonen.

Schließlich wurde mit Hilfe von Funktionsverlustmutanten eine Beteiligung von Scar und Dock an der Muskelanheftung festgestellt. Während von Dock bekannt ist, dass seine mRNA während der für die Myoblastenfusion relevanten Stadien nur im Nervensystem der Embryonen vorliegt (BDGP insitu-Project, Tomancak et al., 2002) und daher eine Relevanz für die Myoblastenfusion unwahrscheinlich ist, ist eine Beteiligung von Scar an der Fusion trotz des fehlenden Fusionsphänotyps nicht auszuschließen, da hier ähnlich wie bei WASp eine hoch dosierte maternale Komponente vorhanden ist. Für letzteres konnte vor kurzem ebenfalls mit Hilfe von Phänotyp-Analysen eine Beteiligung mindestens im zweiten Fusionsschritt gezeigt werden. Die ultrastrukturelle Situation ist dabei jedoch noch unklar (Schäfer et al., in Revision). Darüberhinaus legen die Analysen von *wsp*³-mutanten Embryonen nahe, dass eine Beteiligung bei der Muskelanheftung stattfindet (Schröter, unpublizierte Beobachtung). Die Lösung dieses Problems der Aufstellung einer konsistenten Theorie über den Ablauf der somatischen Fusion, fußend auf morphologischen und molekularen Beobachtungen, könnte eine Überlagerung des morphologisch beobachteten zweistufigen Fusionsprozesses durch zwei molekulare Mechanismen sein: einerseits ein -einstufiger ? - molekularer Zählmechanismus in den Founder-Zellen, der kontinuierlich während der gesamten Myoblastenfusion die Expression der an der Bildung des Zellkontaktes beteiligten Proteine steuert, und andererseits die molekulare Entwicklung des Fusionskomplexes, der nur nach erfolgtem Zellkontakt erfolgen kann (vgl. Modell zur Myoblastenfusion 23, S. 181), für den zweiten Fusionsschritt benötigt wird und dessen Initiation durch Faktoren der fusionskompetenten Myoblasten, wie z.B. Blown fuse, gesteuert wird. Dabei ist nicht auszuschließen, dass gewisse Adaptorproteine, z.B. Crk, und cytoplasmatische Signalproteine wie GEFs z.B. Mbc und Schizo/Loner sowohl an den Feedback-Schleifen, als auch an der Translokation von cytoplasmatischen Proteinen im Zusammenhang mit den Fusionskomplexen beteiligt sind, was zu einer Verschleierung der Verhältnisse bei der phänotypischen Analyse

von Mutanten führt. Schließlich ist zu klären, welche der beteiligten Proteine über die Myoblastenfusion hinaus auch für die Muskelanheftung eine Rolle spielen und welche spezifisch entweder für die Myoblastenfusion oder die Muskelanheftung sind.

21.2. Ein Gleichgewicht von Blow fuse und Kette steuert die Weiterentwicklung des somatischen Fusionskomplexes

Nachdem eine essentielle Beteiligung von Blow und Kette am zweiten somatischen Fusionsschritt festgestellt wurde, ist die genauere Funktion der Proteine in diesem Kontext zu ermitteln. Ausserdem ist zu klären, auf welche Weise die beobachtete genetische Interaktion Einfluss auf die Myoblastenfusion nimmt.

21.2.1. Die beobachteten Phänotypen weisen auf eine Beteiligung von Blow und Kette beim radiären Auseinanderziehen des Fusionskomplexes hin

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl in *blow*- als auch in *kette*-mutanten Embryonen nach dem erfolgten Zell-Zell-Kontakt der Fusionskomplex (oder zumindest Teile davon) etabliert wird (Kesper, Dissertation 2005, Kesper et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Darüberhinaus wurde in den somatischen fusionskompetenten Myoblasten eine deutliche subzelluläre Lokalisation von Blow in Assoziation mit dem Komplex beobachtet (Kesper et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Schließlich sind *blow*-mutante Embryonen nicht in der Lage, den etablierten Präfusionskomplex in eine elektronendichte Heftstruktur zu überführen. Dies wird hier als Unvermögen interpretiert, den Präfusionskomplex auseinander zu ziehen, wobei die molekulare Rolle, die Blow dabei spielt zunächst unklar bleibt. Da jedoch in *blow*-mutanten Embryonen wildtypisch aussehende Actin-Foci beobachtet werden (Schröter, unpublizierte Beobachtung), ist die Ursache der registrierten Defekte wahrscheinlich in der Störung des Transportes von Blow-nachgelagerten Faktoren, die die Ausdehnung des Komplexes bewirken, an die entsprechenden Stellen zu vermuten.

In *kette*-mutanten Embryonen erscheint der Fusionskomplex weiter ausgedehnt, als zunächst im Wildtyp und in *blow*-mutanten Embryonen (Kesper et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass in *kette*-mutanten Embryonen die Aktin-Foci vergrößert und unregelmäßig sind (16.5). Dieser Effekt wird vermutlich durch die fehlende inhibitorische Wirkung, die Kette im Zytosol auf den Aktin-Regulator Scar/WAVE hat, provoziert. In *kette*-mutanten Embryonen

entsteht daher ein dramatischer Überschuss an filamentärem Aktin im Zytosol (Richardson et al., 2006) und da der Fusionskomplex als Nukleationspunkt für die Aktinpolymerisation und das Anheften von F-Aktin dient, kommt es zu einer willkürlichen und unregelmäßigen Erweiterung des Aktinanteils im Fusionskomplex. Dadurch wird vermutlich die exakt zu steuernde laterale Ausdehnung des Fusionskomplexes gestört und es kommt zum Erliegen des Prozesses. Die Erweiterung des Fusionskomplexes stellt sich schließlich im Elektronenmikroskop in Form der überdurchschnittlich elongierten und morphologisch aberranten elektronendichten Plaques dar. So erscheinen die Plaques deutlich unregelmäßiger und dünner als die wildtypischen Plaques, ferner fehlen im Wildtyp gelegentlich beobachtete vom Plaque ausgehende Zytoskelettfasern. Dabei könnte es sich um Aktin-Filamente handeln, deren Bildung von Kette-gesteuerter WASp-Aktivität im Fusionskomplex-Kern abhängig ist. Da eine Aktivierung von WASp durch Kette in der Mutante nicht möglich ist, kommt es nicht zur Elongation der durch den Scar/WAVE-Überschuss initial gebildeten Aktinfilamente an der Membran.

21.2.2. Die genetische Interaktion von *blow* und *kette* im somatischen Mesoderm zeigt, dass beide Gene in einem fein abgestimmten Mechanismus wirken.

In den fusionskompetenten Myoblasten des somatischen Mesoderms könnte es sich bei der genetischen Interaktion zwischen *blow* und *kette* um einen Dosiseffekt handeln, der die Aktinregulation betrifft. Dieser könnte die beobachtete partielle Rettung des *blow*-Phänotyps durch Ektopische Expression von Kette (17.1.2) erklären: Während ein Verlust von *blow* dazu führt, dass für die Aktinpolymerisation notwendige Komponenten - eventuell auch der Kette/Sra-1/Abi-Komplex - nicht mehr zu den initial gebildeten Fusionskomplexen transportiert werden können, provoziert ein Funktionsverlust von *kette* den genannten zytosolischen Aktinüberschuss. Der zusätzliche homozygote Verlust von *blow* im *kette*-mutanten Hintergrund könnte dann in der Doppelmutante nicht nur zur Bildung irregulärer Aktin-Foci an den bereits existierenden Nukleationspunkten, sondern zusätzlich zu einer Unordnung und zu verstärkten willkürlichen Anheftungen des zytosolischen Aktins führen. Das führt zur beobachteten Verstärkung des Phänotyps, da dann in den fusionskompetenten Myoblasten möglicherweise die Polarisierung hin zur Muskelvorläufer-Zelle verloren geht.

Auf diesem Hintergrund erklärt sich die Rettung des *blow*-Phänotyps durch die ektopische Expression von Kette: In diesen *blow*-Mutanten davon auszugehen ist, dass genug Kette-Protein vorhanden ist, um zunächst einen zytosolischen F-Aktin-Überschuss zu verhindern. Das durch die ektopische Expression zusätzlich vorhandene Kette-Protein kann daher genutzt werden, um an der Membran eine zufällige Aktinpolymerisation zu bewirken. Sofern dies an den Stellen geschieht, an denen der Präfusionskomplex gebildet wurde, kann dadurch eine Weiterentwicklung des Fusionskomplexes stattfinden. Somit wird der durch den Mangel an Blow hervorgerufene Stopp der Myoblastenfusion überbrückt und es kommt zur teilweisen Rettung des Phänotyps.

21.3. Die Entwicklung der zirkulären Mitteldarm-Muskeln beinhaltet die Fusion der zirkulären Founder-Zellen mit den viszeralen fusionskompetenten Myoblasten und die Bildung der Netzstruktur während der Streckung um den Darm

Nach der durchgeführten und oben beschriebenen licht- und elektronenmikroskopischen Analyse (13.2 - 13.3), stellt sich die Entwicklung der zirkulären Mitteldarmmuskeln wie folgt dar (siehe Schema Abb. 21.2): Gegen Ende von Stadium 10 bildet sich ein Kontakt zwischen der jeweiligen zirkulären Founder-Zelle und einer ihr direkt benachbarten fusionskompetenten Myoblaste. Dieser Kontakt verdichtet sich deutlich im frühen Stadium 11. Ab der Mitte des Stadium 11 kommt es in mehreren Bereichen der Kontaktstelle zum Membranzusammenbruch. Dabei entstehen partiell mit einander fusionierte zweikernige Syncytien, die in Stadium 12 Spindelform annehmen und beginnen, sich entlang des sich schließenden Endodermrohres zu strecken. Ab dem späten Stadium 12 werden zwischen den Zellkörpern, die die Zellkerne enthalten, die Strings, die zur Bildung der Netzwerkstruktur führen, zunächst im TEM sichtbar. Ab dem Stadium 13 sind sie dann auch im Lichtmikroskop deutlich erkennbar. Während der folgenden Stadien strecken sich die Syncytien um das Darmrohr, wobei die Netzwerkstruktur deutlich zu Tage tritt. Gegen Ende der Embryonalentwicklung ist im Stadium 16 schließlich die Webstruktur der Mitteldarm-Muscularis, die aus den netzförmigen Ringmuskeln und den damit verflochtenen Längsmuskeln besteht,

im Lichtmikroskop sichtbar. Sie persistiert durch die Larvenstadien hindurch wobei die longitudinalen Muskeln auch während der Metamorphose nur geringfügige Umbauten erfahren (Klapper, 2001), die schließlich zu einer Verfeinerung der Struktur im Adultus führen.

21.3.1. Die Fusion der zirkulären Founder-Zelle und der fusionskompetenten Myoblaste erfolgt zwischen unmittelbar benachbarten Zellen und erfordert daher keinen Fusionskomplex

Nach der Einwanderung des Mesoderms und der Determination der viszeralen fusionskompetenten Myoblasten sowie der Founder-Zellen der zirkulären Mitteldarm-Muskeln finden sich die zukünftigen Fusionspartner ähnlich wie bei der ersten somatischen Fusion in unmittelbar benachbarte Zellen. In dieser Nachbarschaftssituation wird durch die membranständigen Signalproteine Sns und Duf der initiale Zellkontakt vermittelt (Klapper et al., 2002). Da die beiden beteiligten Zellen aufgrund ihrer Position jedoch bereits über eine relativ breite Kontaktfront verfügen erscheint die aufwändige Konstruktion eines Fusionskomplexes, wie sie im zweiten somatischen Fusionschritt stattfindet, auch hier nicht notwendig. Stattdessen erfolgt die

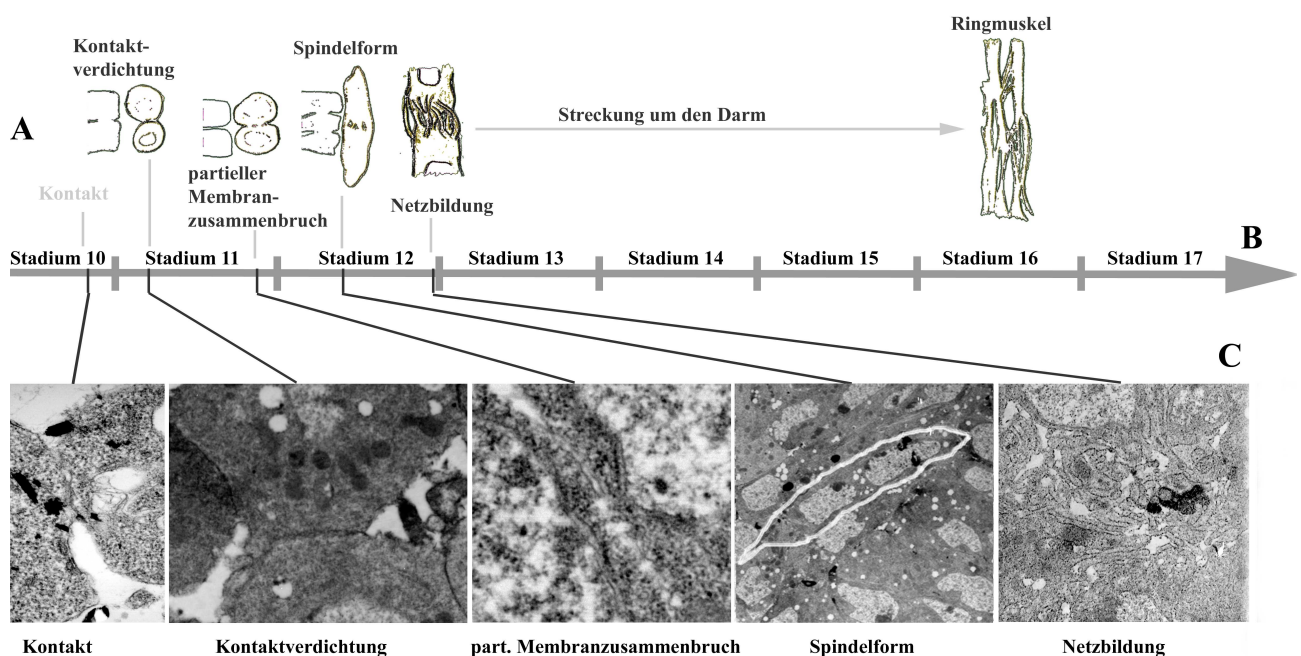


Abbildung 21.2.: Entwicklung der Ringmuskulatur um den Mitteldarm **A** Schematischer Ablauf der Ringmuskel-Entwicklung. **B** Embryonalstadien. **C** Ultrastrukturelle Merkmale.

Stabilisierung des Kontaktes durch das Ausbilden der beobachteten elektronendichten Struktur, die insofern als analoges Merkmal zu den elektronendichten Plaques der zweiten somatischen Fusion gesehen werden kann. Allerdings bleibt auch hier - wie schon bei der ersten somatischen Fusion - offen, welche Funktion eine mögliche Anhäufung von Ionen-Kanälen vor dem Beginn des Membranzusammenbruchs haben könnte.

Ein weiterer Unterschied zum zweiten somatischen Fusionsschritt ist die subzelluläre Lokalisation von Duf. Während dort bei der Etablierung des Fusionskomplexes eine ringförmige Lokalisation der den Zellkontakt moderierenden Proteine Duf und Sns beobachtet wird (Kesper et al., zur Veröffentlichung eingereicht), ist bei den Founder-Zellen der zirkulären viszerale Muskeln eine apikale, über die gesamte potentielle Kontaktfläche ausgedehnte Lokalisation von Duf festzustellen. Darüber hinaus ist Duf in den lateralen Membranbereichen zu finden, an denen die Founder-Zellen untereinander in Kontakt stehen (Kreisköther, mündliche Mitteilung), und vermittelt dort durch homophile Interaktion (Chen et al., 2003; Galetta et al., 2004) den Zusammenhalt des anterior-posterioren Bandes der viszerale Founderzellen. Während die initiale Vermittlung der Zelladhäsion im Lauf der zweiten somatischen Fusionswelle auf der Basis von punktuellen Kontakten erfolgt, erscheint sie bei der Fusion der zirkulären Founder-Zellen mit ihren fusionskompetenten Myoblasten flächig. Die subzelluläre Lokalisation von Duf und Sns im ersten somatischen Fusionsschritt ist bisher nicht geklärt.

21.3.2. Die Entwicklung der Netzstruktur wird durch die partielle Fusion begünstigt

Der punktueller Membranzusammenbruch bei der Fusion der zirkulären viszerale Founder-Zellen mit den fusionskompetenten Myoblasten begünstigt die sich daran anschließende Bildung der Netzstruktur. Obwohl Analysen mit dem TEM stets nur ein statisches Bild der sukzessiv ablaufenden Entwicklungsschritte liefern, kann aufgrund von beobachteten Übergangsstadien während der Spindelform der Zellen vermutet werden, dass die initiale Bildung der Netzmaschen an den Stellen der persistierenden Membranen erfolgt, während die Strings aus den Bereichen hervorgehen, in denen der Membranzusammenbruch stattgefunden hat. Dabei kommt es gelegentlich zur Anordnung von großen, vakuolenähnlichen Vesikeln in der Ebene der partiellen Fusion. Welche Rolle diese jedoch bei den beobachteten Vorgängen spielen

ist unklar, möglicherweise unterstützen sie aber die Bildung der Strings. Um weitere Einsichten in den Prozess zu erhalten, sollte geklärt werden, welches Material die genannten Vesikeln enthalten. Da der Vorgang der Netzbildung in großem Umfang eine Erweiterung der Oberfläche des Syncytiums bedeutet, ist es erforderlich, in einem entsprechenden Maß neue Zellmembran aufzubauen. Der größte Bedarf herrscht in der Mitte zwischen den beiden Zellkörpern an den Stellen der Stringbildung. Daher ist es naheliegend, dass auch der Membranaufbau dort geschieht. Dabei könnte die beobachtete elektronendichte Struktur als Reservoir und Syntheseort dienen.

21.3.3. Die Verflechtung der zirkulären und longitudinalen Muskeln könnte während der Fusion der longitudinalen Muskelvorläufer-Zellen stattfinden

Die ultrastrukturellen Vorgänge, die bei der Fusion der longitudinalen Founder-Zellen mit den restlichen fusionskompetenten Myoblasten des viszerale Mesoderms stattfinden, bleiben zunächst unklar, da diese Muskeln selbst im TEM durch ihre geringe Größe und die laterale Position im Embryo nur schwer zugänglich sind. Zur genauen Auswertung müssten ähnlich wie bei der Verfolgung von Neuronen exakte Serienschnitte herangezogen werden. Dabei muss es sich aber nach Möglichkeit nicht um Quer- sondern um Längsschnitte, die technisch schwieriger zu erhalten sind handeln, um die Fusionsebene zwischen longitudinalen Founder- bzw. Muskelvorläufer-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten korrekt zu erfassen.

Für die Verflechtung der longitudinalen und zirkulären Mitteldarmmuskeln ist jedoch Folgendes vorstellbar: Während die longitudinalen Founder-Zellen vom caudalen Mesoderm her einwandern benutzen sie die sich bildenden zirkulären Muskeln als Substrat. Bereits während der Wanderung finden vermutlich Fusionen zu mehrkernigen Muskelvorläufer-Zellen statt, wie Abbildungen in älteren Veröffentlichungen suggerieren (Georgias et al., 1997; Kusch und Reuter, 1999). Insgesamt erscheint es dabei so, dass die longitudinalen Founder-Zellen bzw. Muskelvorläufer-Zellen oberhalb der sich streckenden zirkulären Muskeln wandern. Die nach der Fusion zu den zirkulären Mitteldarmmuskeln übrig gebliebenen viszerale fusionskompetenten Myoblasten werden jedoch von den sich streckenden zirkulären Muskeln überlagert, wie hier gezeigt wurde (vgl. Abb. 13.5, Seite 92). Die Fusion der longitudinalen Muskelvorläufer-Zellen mit weiteren viszerale fusionskompetenten Myoblasten erfolgt also zwischen zwei Zellpopulationen von denen eine unterhalb und die andere ober-

halb der zirkulären Mitteldarmmuskeln liegt. Um miteinander in Kontakt zu treten, wird daher die Schicht der zirkulären Muskeln an willkürlicher Position durchstossen, die Zellen fusionieren, es kommt jedoch nicht zum totalen Ortswechsel einer der beiden Populationen. Das bedeutet, dass die vormals unterhalb der zirkulären Muskeln lokalisierten fusionskompetenten Myoblasten auch nach der Fusion noch den Teil des longitudinalen Muskels stellen, der unterhalb der zirkulären Muskeln liegt, während der vormals oberhalb der zirkulären Muskeln lokalisierte Teil oberhalb der zirkulären Muskeln verbleibt. Auf diese Weise entsteht die beobachtete Verflechtung der zirkulären und longitudinalen Mitteldarmmuskeln.

21.4. Das Strecken des Syncytiums um den Darm erfordert die Bildung eines korrekt organisierten Aktin-Netzwerkes, was in *kette*-mutanten Embryonen gestört ist

Die ultrastrukturellen und phänotypischen Analysen des somatischen Mesoderms von *blow*- und *kette*-Funktionsverlustmutanten zeigen, dass beide Gene im zweiten somatischen Fusionsschritt beim radiären Auseinanderziehen des Fusionskomplexes eine Rolle spielen (s. 21.2.1). Im ersten somatischen Fusionsschritt spielt *Blow* dagegen keine Rolle. Bei der Betrachtung der Verhältnisse im viszeralem Mesoderm kann für beide festgestellt werden, dass ein Funktionsverlust wie im ersten somatischen Fusionsschritt keine Auswirkung auf das Stattfinden der Fusion hat. Für *kette* bleibt jedoch, wie auch im somatischen ersten Fusionsschritt, unklar, ob die maternale Komponente einen eventuellen Funktionsverlustdefekt ausgleicht. Im Gegensatz dazu tritt in beiden Mutanten deutlich das Unvermögen der Syncytien, sich um den Darm zu strecken, zu Tage. Dies könnte in einer mangelhaften Organisation des Aktin-Zytoskelettes begründet sein; denn es erscheint logisch, dass bei fehlender Aktin-Zytoskelett-vermittelter Stabilität ein Strecken der Muskeln oder gar der Sarkomeraufbau nicht stattfinden kann. Da von *Kette* bekannt ist, dass es sich um einen Regulator der Aktinorganisation handelt (Bogdan und Klämbt, 2003, s. 4), ist es naheliegend, dass der beobachtete Effekt in einer Störung des Aktin-Arrangements begründet ist.

In Bezug auf *blow*-mutante Embryonen ist die Erklärung nicht so eindeutig, da es sich bei *Blow* nicht um einen direkten Aktin-Regulator handelt. Indem jedoch zumindest für das somatischen Mesoderm gezeigt werden konnte, dass *blow* und *kette*

in einem engen Kontext agieren, ist davon auszugehen, dass auch hier eine indirekte Störung des Wachstums durch das Fehlen des Aktin-Arrangements stattfindet. So ist vorstellbar, dass Blow in den fusionierten Synzytien die Translokation von notwendigen Proteinen zu den entsprechenden Nukleationspunkten, an denen die Aktinpolymerisation extendiert werden muss, koordiniert oder als Effektor für verschiedene GTPase, wie z.B. Rac1, wirken kann.

21.5. Vergleich der zirkulären viszeralen und der somatischen Myogenese

Betrachtet man zunächst die Morphologie der zirkulären Mitteldarmmuskeln und der somatischen Muskeln von *Drosophila*, so erscheint bei einem oberflächlichen Blick als einziges gemeinsames Merkmal, dass es sich in beiden Fällen um quergestreifte Muskelzellen handelt. Während die zirkulären Mitteldarm-Muskeln dabei stets zweikernig sind (Klapper et al., 2002) und eine in dieser Form einzigartige netzförmige Gestalt besitzen (Schröter et al., 2006, 13.1.1), handelt es sich bei den somatischen Muskeln um vielkernige und in der Gestalt massive Syncytien (Bate, 1993). Bei genauerem Hinsehen entpuppen sich jedoch mehr Gemeinsamkeiten, so spielen bei der Entwicklung von beiden Muskeltypen Duf-positive Founder-Zellen und Sns-positive fusionskompetente Myoblasten eine Rolle (San Martin et al., 2001, Klapper et al., 2002). Im Folgenden soll aufgezeigt werden, dass es auch in Bezug auf die Fusionsmechanismen und das darüberhinausgehende Wachstum und Attachment der Muskeln Gemeinsamkeiten, aber auch distinkte Unterschiede gibt.

21.5.1. Die partielle Fusion der zirkulären viszeralen Founder-Zelle mit den fusionskompetenten Myoblasten ist ein großer Unterschied zum ersten somatischen Fusionsschritt

Zu Beginn beider Fusionsmechanismen steht die Bildung eines Kontaktes zwischen einer Duf-positiven Founder-Zelle und einer ihr direkt benachbarten Sns-positiven fusionskompetenten Myoblaste. Dabei wird in beiden Fällen kein Fusionskomplex beobachtet, sondern das direkte Auftreten einer dichten Kontaktstruktur, die im viszeralen Mesoderm entfernt an eine Anhäufung von Gap Junctions erinnert. Direkt im Anschluss an das Auftreten der Kontaktstruktur findet die Fusion der Founder-Zelle mit der bzw. den fusionskompetenten Myoblasten statt. Dabei ist wiederum beiden Prozessen gemeinsam, dass Blown fuse nicht an der Fusion beteiligt ist, wo-

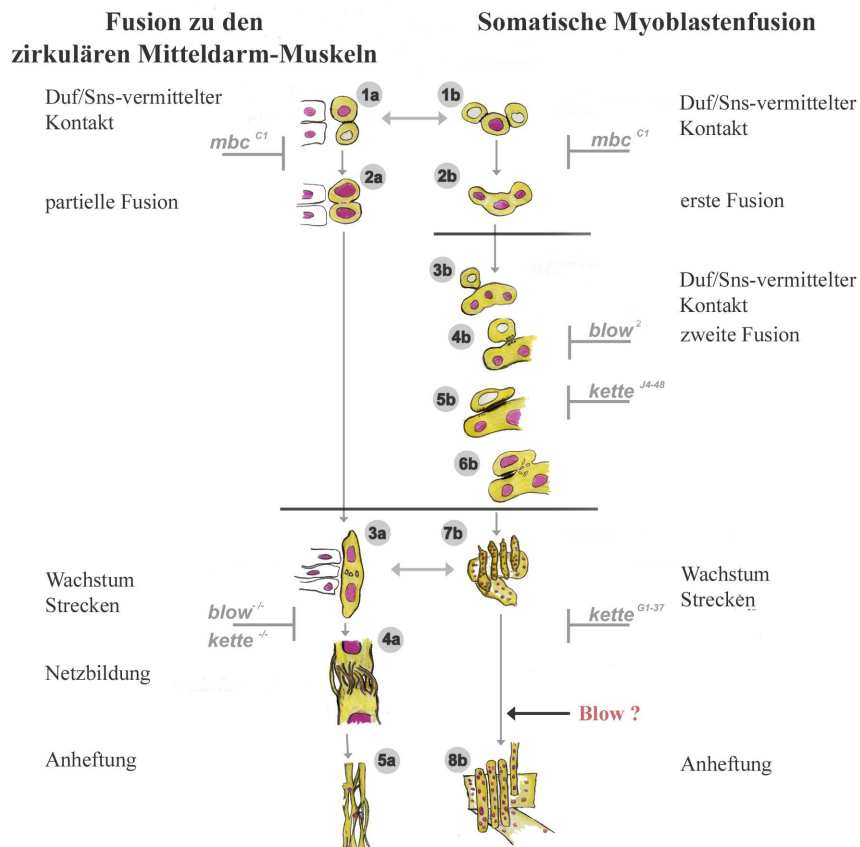


Abbildung 21.3.: Vergleich der somatischen Myoblastenfusion mit der Fusion zu den zirkulären Mitteldarm-Muskeln: **1a** Verdichteter Kontakt zwischen zirkulärer Founder-Zelle und fusionskompetenter Myoblaste. **1b** Duf/Sns-vermittelter Kontakt zwischen somatischer Founder-Zelle und fusionskompetenten Myoblasten. **2a** Partielle Fusion im viszeralem Mesoderm. **2b** Totale Fusion im somatischen Mesoderm, Bildung der Muskelvorläufer-Zelle. **3b - 6b** zweiter Fusionschritt im somatischen Mesoderm. **3b** Duf/Sns-vermittelter Kontakt zwischen Muskelvorläufer-Zelle und fusionskompetenten Myoblasten. **4b** Präfusionskomplex aus elektronendichten paarig angeordneten Vesikeln. **5b** Auseinanderziehen des Präfusionskomplexes und Etablierung elektronendichter Plaques in dessen Mitte. **6b** Membranzusammenbruch im Inneren der ringförmig auseinandergezogenen elektronendichten Plaques. **3a, 7b** Wachstum und Strecken der Syncytien nach dem Erreichen der terminalen Kernanzahl. **4a** Während der Streckung um den Darm bildet sich die Netzstruktur der Mitteldarm-Muskeln. **5a, 8b** Anheftung der Muskeln.

hingegen ein Ausfall von Mbc die Fusion unterbindet. Aufgrund der vorhandenen maternalen Komponente ist eine Beteiligung von Kette an dieser Fusion unklar, jedoch ist auch hier zunächst kein Unterschied zwischen der ersten somatischen und der zirkulären viszeralem Fusion zu erkennen.

Der auffälligste und gravierendste Unterschied zwischen der ersten somatischen Fusion und der Fusion, die zu den zweikernigen zirkulären Mitteldarm-Muskeln führt, ist der partielle Charakter der viszeralem Fusion im Gegensatz zur totalen Fusion

im somatischen Mesoderm. Während in Bezug auf die Ausbildung des Kontaktes durchaus ähnliche, durch Duf und Sns gesteuerte, molekulare Zell-Zell-Adhäsions-Mechanismen vorstellbar sind, muss hier ein, wenn auch möglicherweise ursprünglich verwandter, so doch deutlich in der molekularen Funktion unterschiedlicher Fusionsmechanismus gefordert werden. Dafür erscheint es notwendig, dass die Ausdehnung der Fusionspore (vgl. 6.1) an den Stellen inhibiert wird, an denen kein Membranzusammenbruch stattfindet. Man kann darüber spekulieren, dass dies durch die inhibitorische Funktion, die Hibris auf Sns in den fusionskompetenten Myoblasten ausübt (Artero et al., 2001), oder durch einen alternativen Weg in den Founder-Zellen moderiert wird. In den Bereichen, in denen es zum Membranzusammenbruch kommt, könnte eine dem somatischen Mesoderm ähnliche Interaktion von Sns mit Duf vorliegen, wodurch jeweils eine Signalkaskade, die zum Membranabbau führt, initiiert wird. Dagegen wäre in den Bereichen, in denen es nicht zum Membranzusammenbruch kommt, eine Inhibition von Sns durch Hbs möglich, so dass die Signalkaskade in den fusionskompetenten Myoblasten nicht gestartet werden kann. Daraus würde sich in den Founderzellen ebenfalls eine Inhibition der Signalkaskade ergeben, da Duf nicht mit Sns interagieren kann und damit der Trigger für den Start der Kaskade fehlt. Daraus folgend ist für das somatische Mesoderm dann zu fordern, dass Hbs selbst spätestens nach dem Beginn des Membranzusammenbruchs inhibiert wird. Um dies näher zu untersuchen, sollte in weiterführenden Experimenten zunächst die detaillierte subzelluläre Lokalisation von Sns und Hbs im viszerale Mesoderm geklärt werden. Unklar bleibt dabei im Moment, welche Komponenten für den Aufbau der elektronenoptisch dichten Kontaktstruktur verantwortlich sind. Da die Struktur jedoch rein morphologisch an die Struktur von Gap Junctions erinnert, könnte es sich um eine Anhäufung von Ionen-Kanälen handeln, von denen bekannt ist, dass sie für die Myoblastenfusion der Wirbeltiere essentiell sind (Übersichtsartikel: Cooper, 2001).

Zusammenfassend lässt sich über den ersten somatischen Fusionsschritt und die Fusion der zirkulären viszerale Founder-Zellen mit fusionskompetenten Myoblasten feststellen, dass die Etablierung des ersten Zell-Zell-Kontaktes auf ähnliche Weise in Abhängigkeit von Duf und Sns erfolgt. In beiden Fällen findet die Fusion zwar ohne das Auftreten eines Fusionskomplexes bzw. die Einbeziehung von Blow aber unter Verwendung von Mbc statt. Der eigentliche Fusionsmechanismus läuft jedoch jeweils

unterschiedlich ab und führt zu morphologisch stark unterschiedlichen Muskeln.

21.5.2. Der zweite somatische Fusionsschritt hat kein Äquivalent bei der Bildung der zirkulären Mitteldarm-Muskeln, da dort die Myoblastenfusion nach einem Schritt beendet wird

Während zwischen dem ersten somatischen Fusionsschritt und der Fusion zu den zirkulären Mitteldarm-Muskeln gewisse Parallelen entdeckt werden können, stellt der zweite Fusionsschritt aufgrund des vorhandenen Fusionskomplexes einen nicht mit der Fusion im viszerale Mesoderm vergleichbaren Mechanismus dar. Es muss allerdings auch festgehalten werden, dass die Fusion, die zu den zirkulären Mitteldarm-Muskeln führt, nach dem ersten Schritt beendet ist und daher kein dem zweiten somatischen Schritt ähnlicher Prozess benötigt wird. Anders ist die Situation bei der Bildung der longitudinalen Mitteldarm-Muskeln. Diese bestehen aus bis zu sechskernigen Syncytien und der Fusionsmechanismus ist bislang völlig unbekannt, da er im TEM aufgrund der vereinzelter Lage der longitudinalen viszerale Founder-Zellen nur sehr schwer zugänglich ist. Es kann daher für diesen Mechanismus nicht ausgeschlossen werden, dass sich ähnliche Strukturen wie beim zweiten somatischen Fusionsschritt finden.

21.5.3. Die unterschiedliche Verwendung von *Blow* in der somatischen und der viszerale Myogenese

Während zwischen beiden Myogenese-Prozessen die Bildung des initialen Zell-Zell-Kontaktes ähnlich ist, fallen schnell sowohl auf morphologischer als auch molekularer Ebene Unterschiede auf. So ist die Expression von *Blown fuse* im somatischen Mesoderm zunächst auf die fusionskompetenten Myoblasten beschränkt, während sie im viszerale Mesoderm in beiden Populationen erfolgt (14.1). Dabei ist die beobachtete separate Lokalisation von Enhancer-Elementen, die die Expression im viszerale Mesoderm steuern, im ersten Intron von *blow* eine typische Eigenschaft von Genen, die im viszerale Mesoderm essentiell sind (Kremser et al., 1999; Sellin et al., 2006). Auch legt die offensichtliche Beteiligung von mehreren verschiedenen Faktoren an der Transkription von *blow* nahe, dass die Expression von *Blow* aufgrund von differenzierten Antworten auf verschiedene Signale hin zustande kommen kann. Dies ist möglicherweise in Übereinstimmung mit zwei unterschiedlichen Verwendungen von *Blown fuse* in beiden Prozessen zu sehen. Während das Protein bei der somatischen

Myoblastenfusion zur Weiterentwicklung des Fusionskomplexes in den fusionskompetenten Myoblasten benötigt wird, hat es in den zirkulären Mitteldarm-Muskeln und in den fertig fusionierten Muskeln des späten somatischen Mesoderms offensichtlich eine Funktion bei der Streckung und beim Wachstum der Syncytien. Dabei stellt sich jedoch die Frage, ob es sich in der Tat um unterschiedliche Funktionen des Proteins, um Variationen einer bestimmten Signalkaskaden oder sogar um die selbe ablaufende Signalkaskade handelt. Einen Hinweis darauf, dass es sich vermutlich um Variationen einer Signalkaskade handelt, geben die beobachteten Defekte bei der Muskelstreckung in *dock*- und *scar*-mutanten Embryonen, da z.B. bekannt ist, dass während der fusionsrelevanten Stadien im somatischen Mesoderm keine Transkription von *dock* vorliegt (BDGP-in-situ-Project, Tomancak et al., 2002) und demzufolge ein anderes Protein die Funktion des SH2-SH3-Adaptors übernehmen sollte.

21.5.4. Die Streckung der zirkulären Muskeln und die Anheftung der somatischen Muskeln könnten zur Neurogenese homologe Prozesse beinhalten

Nachdem die Syncytien die gewünschte Anzahl an Fusionen durchlaufen haben, findet sowohl im viszeralen als auch im somatischen Mesoderm ein Muskelwachstum und -strecken statt, welche mit der Verankerung der Muskeln enden. Während dabei die somatischen Muskeln ihre massive Struktur beibehalten und sich an der Epider-

	Zell-Determination	Fusion	zielgerichtetes Strecken/Wachsen
<i>Neurogenese</i>	laterale Inhibition	(keine Fusion)	<i>kette, blow, ena, Cbl, Abl, Src</i>
<i>somatische Myogenese</i>	laterale Inhibition Duf-positive Founder Sns-positive FCM's	1. <i>mbc</i> 2. <i>kette, blow, Rols7</i>	<i>kette, blow, ena, Rols7, Cbl, Abl, Src</i>
<i>viszerale Myogenese</i> <i>zirkulärer Muskeln</i>	Jeb-/Alk-Signalling	<i>mbc</i>	<i>kette, blow</i>

Abbildung 21.4.: Zwischen der Neurogenese und der Myogenese können bezüglich des gerichteten Wachstums und der Streckung der Muskeln bzw. Axonspitzen molekulare Parallelen gezogen werden.

mis verankern, bilden die zirkulären Mitteldarm-Muskeln die beschriebene Netzform aus. Sie strecken sich um den Darm bis sie sich an ihrem jeweils gegenüberliegenden Partner-Muskel verankern. Obwohl dies morphologisch zunächst sehr unterschiedlich erscheint, sind auf der molekularen Ebene doch ähnliche wenn nicht sogar die gleichen Mechanismen involviert, so sind in beiden Fällen *Blow* und *Kette* für das korrekte Strecken bzw. die Verankerung der Muskeln essentiell. Dies könnte ein Hinweis auf die Homologie der beiden Prozesse sein, der jedoch sicherlich durch die Analyse weiterer Gene, wie z.B. *dock* und *scar* in Bezug auf das viszerale Mesoderm, in noch folgenden Experimenten untermauert werden muss. Weiterhin kann hier ein Vergleich mit dem Wachstum und Strecken der Axonspitzen während der Neurogenese gezogen werden. Auch dieser Prozess ist, wie in der Einleitung beschrieben, von massivem Aktinrearrangement, das unter anderem durch *Kette*, *Wasp*, *Dreadlocks* und *Scar* gesteuert wird, abhängig. Diese These wird durch die beobachteten Anheftungsfehler in *ena*- und *Cbl*-mutanten Embryonen unterstützt. In beiden Fällen handelt es sich ebenfalls um Gene, deren Produkte das zielgerichtete Wachstum und Strecken der Axonspitze in Abhängigkeit von der Abelsonkinase, deren Funktionsverlust ebenfalls zu Anheftungsdefekten führt, regulieren (Bashaw et al., 2000; Comer et al., 1998; Gertler et al., 1990 und 1995; Grevenkoed et al., 2003; Hime et al., 1997 und 2001; Jekely et al., 2005; Li et al., 2005; Smit und Borst, 1997; Wills et al., 1999). Insgesamt liegt daher die Vermutung nahe, dass homologe Prozesse einerseits in der Myogenese zum gerichteten Wachstum und zur Anheftung der Muskeln an die Epidermis bzw. zum Strecken um den Darm führen und während sie andererseits das zielgerichtete Wachstum der Axone in der Neurogenese steuern. Alle diese Prozesse sind abhängig von *Kette*, die Relevanz von *Blown fuse* in der Neurogenese wurde bisher als Sekundäreffekt beurteilt (Heitzler et al., 1993, Van Vactor et al., 1993), sollte aber aufgrund der beobachteten Expression von *Blown fuse* im Nervensystem noch einmal eingehender untersucht werden. Die beiden beobachteten Fusionmechanismen sind von dem beschriebenen Streckungsmechanismus zu unterscheiden und die Fusion der somatischen Myoblasten stellt einen eigenen molekularen Mechanismus dar. Dieser stimmt zwar mit der Streckung und Anheftung der Muskeln dahingehend überein, dass unter anderem *Blown fuse* und *Kette* essentiell sind, stellt aber einen eigenen Mechanismus dar, der auch nicht mit der Fusion der zirkulären viszerale Muskeln, die unabhängig von *Blow* und *Kette* ist,

verglichen werden kann. Insgesamt stellt sich die Situation daher wie folgt dar (vgl. Schema Abb. 21.4):

1. Die Determination der an der Fusion beteiligten Myoblastenpopulationen führt sowohl im somatischen als auch im viszeralem Mesoderm zu Duf-positiven Founder-Zellen und Sns-positiven fusionskompetenten Myoblasten. Der molekulare Ablauf der Determination ist jedoch in beiden Geweben unterschiedlich, so erfolgt die viszerale Determination in einer Weise in Abhängigkeit von Jeb und Alk, die im somatischen Mesoderm deutlich anders erscheint (Stute et al., 2004) und die Determination der somatischen Progenitor-Zellen erinnert eher an die laterale Inhibition bei der Bildung der neuronalen Progenitor-Zellen.
2. Die Fusion der somatischen und zirkulären Muskeln ist mit Ausnahme der initialen Duf-Sns-vermittelten Kontaktetablierung nicht vergleichbar und erfolgt nach einem jeweils eigenen und molekular unterschiedlichem Mechanismus. Parallelen sind höchstens zwischen dem ersten somatischen Fusionsschritt und der zirkulären viszeralem Fusion zu entdecken, da beide auf der molekularen Ebene z.B. von *mbc* abhängig sind.
3. Das zielgerichtete Strecken und Wachstum sowohl der somatischen und zirkulären viszeralem Muskeln als auch der Axonspitzen ist dagegen vermutlich von einer in allen drei Prozessen homologen Signalkaskade gesteuert, die neben verschiedenen signaltransduzierenden Proteinen Kette und Blow beinhaltet.

22. Putative Funktion von Blown fuse, erhalten durch Vergleich mit homologen Sequenzen

Zur biochemischen Aufklärung der Funktion eines Proteins ist es wichtig, seine Tertiärstruktur zu kennen. Diese kann mit hohem Aufwand z.B. durch NMR oder Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden. Näherungsweise können jedoch auch unter Ausnutzung bereits bekannter experimentell gewonnener Daten Vorhersagen, die auf der Kenntnis der Primärstruktur basieren, gemacht werden. Dabei gibt es zum einen die Möglichkeit den Faltungsprozess des Proteins mit Hilfe eines Kraft-Feldes zu simulieren (Duan et al., 1998; Hansmann et al., 1999; Oldziej et al., 2005). Eine andere Möglichkeit ist die Vorhersage durch den Vergleich mit homologen Sequenzen oder Sequenz-Fragmenten (Bystroff et al., 1996, Hvidsten et al., 2003). Die Grundlage dafür ist ein möglichst gutes Sequenz-Alignment der zu vergleichenden Proteine. Idealerweise werden dafür Sequenzen orthologer Proteine verwendet (Tatusov et al., 1997; Hofmann, 1998). Dabei können unter Verwendung der gängigen Algorithmen orthologe Proteine, die eine Sequenzidentität von mehr als 30% aufweisen identifiziert werden (Sander und Schneider, 1991). Darüberhinaus wurden in den letzten Jahren mehrere Aminosäure-Substitutions-Matrizen entwickelt, um auch weitverwandte Sequenzen mit geringerem Identitätslevel möglichst optimal zu alignen (Overington et al., 1992; Prlic et al., 2000; Quian et al., 2002; Hourai et al., 2004).

Zur Aufklärung der Funktion von Blown fuse wurde zunächst mit Hilfe von Sequenzvergleichen nach homologen Proteinen gesucht. Dabei wurde neben mehreren zwischen 60% und 98% identischen Proteinen aus verschiedenen anderen *Drosophila*-Spezies ein zu 29% identisches Protein aus *Anopheles gambiae* als orthologes Protein identifiziert. Weitere Sequenzvergleiche legen nahe, dass es sich bei diesem Protein um ein homologes Protein zu den beiden *Danio rerio*-Paralogen Skap-55 und Skap-Hom/Scap2 handelt. Dabei liegt eine höhere Sequenzidentität zu Skap-55R/Skap-Hom/Scap2 als zu Skap-55/Scap1 vor, so dass davon ausgegangen wird, dass Skap-55R/Skap-Hom/Scap2 das orthologe Protein zu ENSANG00000024571 und zu Blown fuse ist. Schließlich wurde mit Hilfe der ektopischen Expression von

Scap2 in der *twist*-Domäne von *Drosophila*-Embryonen gezeigt, dass das Protein in einer funktionalen Form translatiert werden kann und dass ein gewisser Effekt auf die Entwicklung des Mesoderms ausgeübt wird. Dieser könnte in Übereinstimmung mit beobachteten Effekten bei der ektopischen Expression von *Blown fuse* im Mesoderm stehen. Auch hier fallen im Gegensatz zur ektopischen Expression von Kette Defekte auf. Ebenfalls keine Rettung des *blown fuse*-Phänotyps zeigt eine ektopische Expression des unter 18.3.1 beschriebenen *Blow* Δ N-Y342H-Konstruktes, was zur Spekulation über die Essentialität des N-Terminus sowie der zwischen *Blow* und *Skap*-Hom hochkonservierten Phosphorylierungsstelle Y342 anregt. Diese Ergebnisse sind jedoch sehr präliminär und entsprechende weiterführende Versuche und Kontrollen müssen in der Zukunft durchgeführt werden.

22.1. Die PH-Domäne intendiert eine Zytoskelett- oder Plasmamembran-assoziierte Funktion von *Blown fuse*

Die zentrale funktionale Domäne von *Blown fuse* ist die Pleckstrin-Homologe-Domäne (PH-Domäne), die die Aminosäuren 205 bis 306 umfasst. Diese weist auf eine mögliche Assoziation von *Blown fuse* mit der Plasmamembran bzw. Komponenten des Cytoskelettes hin. So ist von verschiedenen Proteinkinasen bekannt, dass sie über ihre PH-Domäne Phosphoinositide, die in der Plasmamembran lokalisiert sind binden (Lemmon et al., 2000; Rebecchi und Scarlata, 1989; Paterson et al., 1995; Varnai und Balla, 1998; Stauffer et al., 1998; Franke et al., 1997; Frech et al., 1997; Stephens et al., 1993; Watton und Downward, 1999). Dabei ist zu beobachten, dass es eine kleine Gruppe von PH-Domänen gibt, die mit einer hohen Affinität und Spezifität bestimmte Phosphoinositide binden während die Mehrheit dazu nur mit geringer Affinität in der Lage ist. Während erstere klar auf ein Signal hin als Membrantransport-Module wirken, ist für die “low-affinity“-PH-Domänen fraglich, ob sie alleine in der Lage sind die Translokation des entsprechenden Proteins zur Membran zu veranlassen (Lemmon et al., 2002). Über die Interaktion mit Phospholipiden hinaus wird für diese PH-Domänen eine Funktion bei der Protein-Protein-Interaktion postuliert. Diese steht häufig im Zusammenhang mit der Organisation des Aktin-Zytoskelettes. Dabei ist häufig eine Beteiligung bei der Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie (Jaffe et al., 2003; Kim et al., 2002) und Integrinen zu beobachten (Ma et al., 1999; Roll et al., 2000). Ausserdem konnten Interaktionen von PH-Domänen mit Rac GT-

Pasen gezeigt werden (Snyder et al., 2003), sowie eine *in-vitro*-Interaktion mit ARF (Godi et al., 2004). Es wird darüber spekuliert, dass die jeweiligen PH-Domänen enthaltenen Proteine Effektoren der genannten GTPasen sind, da sie jeweils nur die GTP-geladene Form der GTPasen binden (Lemmon, 2004).

Diese Daten stehen in guter Übereinstimmung mit der beobachteten Ko-Lokalisation von Blown fuse mit dem Aktin-Zytoskelett (14.1, S. 96), die in Zell-Kultur-Experimenten bestätigt wurde (Stute, mündliche Mitteilung). Auch eine Lokalisation in Richtung der Zellmembran erscheint nicht unwahrscheinlich, da die bereits erwähnte Akkumulation von Blow im Bereich des Fusionskomplexes an der Zell-Membran beobachtet wurde (Kesper et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Diese ist jedoch nicht nur auf die Zell-Membran beschränkt, vielmehr liegt das Protein in den fusionskompetenten Myoblasten in einem gewissen Umfang cytoplasmatisch vor und es hat den Anschein, dass es erst auf den erfolgreich vermittelten Zell-Kontakt hin in die Nähe der Fusionsstelle transportiert wird (Kesper et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Schließlich unterstützt auch die gefundene genetische Interaktion mit dem Aktin-Regulator Kette die These, dass Blow als PH-Domänen-Protein in die Regulation des Aktin-Zytoskelettes involviert ist. Dabei würde eine Rolle als Effektor einer kleinen GTPase gut zu der oben diskutierten Aufgabe bei der Weiterentwicklung des Fusionskomplexes (21.2.1) passen. Erstaunlich erscheint auf den ersten Blick, dass Blown fuse nur in den fusionskompetenten Myoblasten des somatischen Mesoderms exprimiert wird, während ein Funktionsverlust von *blow* dennoch einen symmetrisch angeordneten Präfusionskomplex liefert. Auf den zweiten Blick offenbart sich aber, dass die ultrastrukturellen Merkmale in den beteiligten Zellen durch unterschiedliche Signalkaskaden entstehen und daher nur morphologisch als symmetrisch zu betrachten sind (s.u., Fazit).

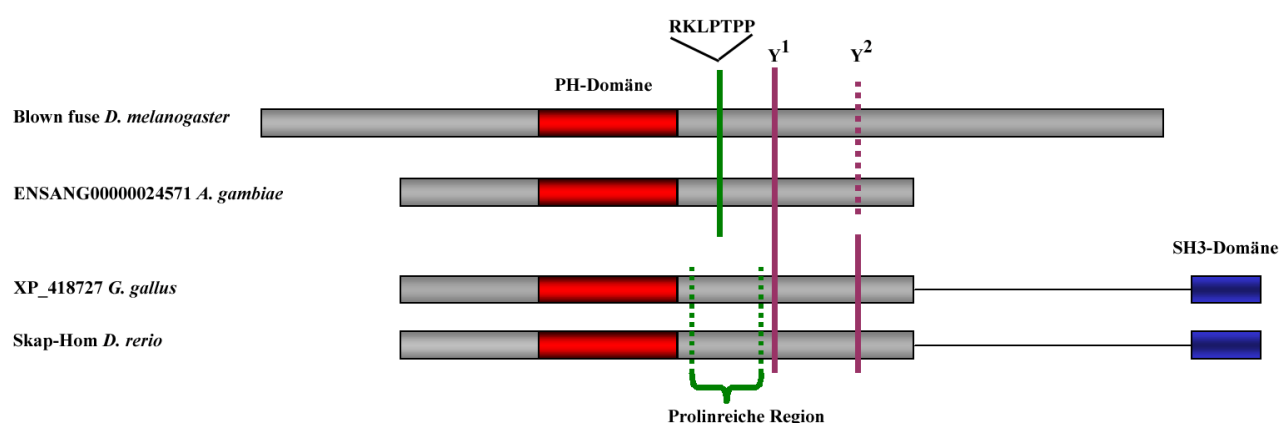
22.2. Der Sequenz-Vergleich mit Skap55R/Skap-Hom/Scap2 und die *in-silico*-Analyse legen eine Phosphorylierung an Position Y342 und die Funktion von Blow als Adaptor-Protein nahe

Da das Wirbeltier-Protein Skap-Hom als orthologes Protein zu Blown fuse bestimmt wurde, liegt es nahe, bereits experimentell bestimmte Daten, die über Skap-Hom vorliegen, als Informationsquelle heranzuziehen. Obwohl natürlich beachtet werden

muss, dass es sich um Proteine aus relativ weit entfernt verwandten Spezies handelt, können daraus doch erste Schlüsse über die Funktion von Blown fuse gezogen werden. Auffällig ist dabei zum einen die relativ hohe Konservierung der PH-Domäne mit über 35% Identität in allen Fällen. Dagegen ist zwischen PH-Domänen von Proteinen, die funktional nicht verwandt sind nur eine Sequenzidentität von 10% bis maximal 30% üblich (Lemmon et al., 2000). Weiterhin fallen als konservierte Elemente die Prolinreiche Region um die Position P325 und die Tyrosin-Phosphorylierungsstelle an Position Y342 auf.

22.2.1. Skap-55R/Skap-Hom/Scap2 als Adaptor-Protein der T-Zell-Synapse

Skap-Hom/Skap-55R wurde 1998 als paraloges Protein zum humanen Protein Src-kinase-associated-protein of 55 kD (Skap-55) beschrieben (Marie-Cardine et al., 1998a; Liu et al., 1998)). Während Skap-55 ausschließlich in T-Lymphozyten exprimiert wird, ist Skap-Hom in nahezu allen Immunzellen zu finden (Curtis et al., 2000; Kouroku et al., 1998; Marie-Cardine et al., 1998a). Beide Proteine verfügen über eine PH-Domäne, gefolgt von zwei (Skap-Hom) bzw. drei (Skap-55) Tyrosin-Phosphorylierungs-Stellen und einer SH3-Domäne (Marie-Cardine et al., 1998b). Der wesentliche Unterschied zwischen beiden ist eine N-terminal der PH-Domäne gelegene coiled-coil-Domäne, die Skap-Hom besitzt Skap-55 jedoch nicht. Beide Proteine wirken als spezifische Adaptor-Proteine während der Signaltransduktion der Immunologischen Synapse und bilden eine funktionale Einheit mit dem Adaptor-Protein



Y1 = IYEE-**PD** in Blown fuse bzw. ENSANG00000024571: spezifisches Motiv für die Phosphorylierung durch die Abelsonkinase
IYEELPD in Skap-55/Scap2 bzw. Skap-Hom/Skap-55R/Scap2: spezifisches Motiv für die Phosphorylierung durch Src-Kinasen

Abbildung 22.1.: Blown fuse ist homolog zu Skap-Hom/Skap-55R/Scap2

ADAP.

Nach dem initialen Zell-Zell-Kontakt dienen beide Proteine dazu, den Kontakt zwischen der T-Zelle und der Antigen-Präsentierenden-Zelle (APC) zu stabilisieren und auszubauen (Rudd und Wang, 2003; Simeoni et al., 2004). Dabei ist an der T-Zell/APC-Kontaktstelle eine Kolokalisation mit F-Aktin und in der Folge eine Clusterung von LFA-1, die zum weiteren Ausbau des SMAC (supramolecular activation cluster) führt, zu beobachten (Wang et al., 2003, Jo et al., 2005). Dieser Prozess verläuft in asymmetrischer Weise in der T-Zelle jedoch nicht in der Antigen-Präsentierenden Zelle (vgl. Einleitung). Der molekulare Ablauf ist bisher nur in Fragmenten bekannt, es wird aber davon ausgegangen, dass eine Phosphorylierung von Skap-55 bzw. Skap-Hom durch Fyn, eine Kinase der Src-Familie, als initiales Signal für die weitere Interaktion mit SH2-Domänen enthaltenden Proteinen dient (Kennedy et al., 1999). Eine Rolle bei der Kopplung der T-Zell-Aktivierung und des Aufbaus des pSMAC durch die LFA-1-Clusterung spielt vermutlich eine Kaskade, die ein ZAP-70 vermitteltes Tyrosin-Phosphorylierungssignal über die Adaptorproteine SLP-76 und Vav1 an den ADAP/Skap-55- bzw. ADAP/Skap-Hom-Komplex weiterleitet, woraufhin eine Aktivierung von kleinen GTPasen und schließlich eine Polarisierung des Aktin-Zytoskelettes unter Beteiligung von WASp stattfinden kann (Jacobelli et al., 2004).

22.2.2. Die Phosphorylierung von Blown fuse kann sowohl durch die Abelson-Kinase als auch durch eine Src-Kinase erfolgen

Nachdem Blow an Position Y342 vermutlich durch eine zytoplasmatische Tyrosin-Kinase phosphoryliert wird, wurden verschiedene bekannte Tyrosin-Kinasen auf ihre Beteiligung an der somatischen Myoblastenfusion hin überprüft. Anhand der gewonnenen Phänotypen läßt sich schließen, dass die Abelsonkinase auf jeden Fall in die Entwicklung des Mesoderms und speziell in die Myoblastenfusion involviert ist. Dagegen sind die Src- und Tec-Kinasen Src42A, Src64B und Btk entweder nur in äußerst redundanter Weise (Lu und Li, 1999; Takahashi et al., 1996), ggf. sogar unter Einbeziehung noch weiterer Src-Kinasen, oder gar nicht an der Myoblasten-Fusion beteiligt. Während zwar der Vergleich mit Skap-55 und Skap-Hom eine Phosphorylierung durch eine der Src-Kinasen nahelegt, ist das zu phosphorylierende Motiv in Blow und ESANG00000024571 im Vergleich zu Skap-55 und Skap-Hom um eine Aminosäure abgewandelt, so dass aus I-Y-E-E-L-P-D das für die Abelson-Kinase ty-

pische und spezifische Substratmotif I-Y-E-E-P-D entsteht (Songyang et al., 1995). Für die Aufstellung einer weiterführenden Arbeitshypothese wird daher davon ausgegangen, dass die Ablason-Kinase die verantwortliche Kinase ist. Es bleiben jedoch zum einen eine direkte physikalische Interaktion und zum anderen die Phosphorylierung ggf. im *in-vitro*-Test zu zeigen. Ferner ist vorstellbar, dass Blown fuse je nach Situation sowohl von der Ablason-Kinase als auch von einer der Src-Kinasen modifiziert werden kann.

22.3. Blown kann sowohl mit SH3- als auch mit SH2-Domänen interagieren

Neben der PH-Domäne sind die wichtigsten strukturellen Merkmale des Proteins Blown fuse die Bindemotive für SH3- und SH2-Domänen. Insgesamt wird Blown fuse zum einen durch den Vergleich mit den Skap-Proteinen, zum anderen durch das Vorhandensein der PH-Domäne und der genannten Bindemotive als Adaptor-Protein charakterisiert. Dabei sind verschiedene Konstellationen für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen denkbar, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

22.3.1. Eine Interaktion mit dem SH2-SH3-Adaptor Crk könnte eine Translokation des cytoplasmatischen Blown-Proteins an die Membran verursachen

Das SH2-SH3-Adaptor-Protein Crk kann potentiellerweise auf verschiedene Arten mit Blown fuse interagieren. So ist zum einen die SH2-Domäne nach einer Phosphorylierung der Blown-Position Y342 in der Lage diese zu erkennen, zum anderen kann die N-terminale SH3-Domäne mit dem Motiv P-x-x-P-x-K an der Position 360-365 spezifisch wechselwirken und schließlich finden sich mehrere P-x-x-P-Motive an den Positionen P141, P322, P357, P378, P381, P476, P565, P569 und P626, die als nicht-kanonische Motive mit der C-Terminalen SH3-Domäne unspezifisch interagieren können. Da das Nck homologe Protein Dock nicht im somatischen Mesoderm vorhanden ist, muss gefordert werden, dass falls eine nur entfernt zur Neurogenese ähnliche Kaskade zur Aktin-Polymerisation führt, ein anderer SH2-SH3-Adaptor die Rolle von Nck/Dock übernimmt. Da Crk bereits früher im Zusammenhang mit der Regulation des Aktin-Cytoskelettes für eine Rolle bei der somatischen Myoblastenfusion vorgeschlagen wurde (Galletta et al., 1999; Nolan et al., 1998), erscheint es im Zusammenhang mit den hier gewonnenen Daten als guter Ersatz für Nck/Dock.

So ist es auf jeden Fall im Mesoderm zum fraglichen Zeitpunkt vorhanden (Galetta et al., 1999; eigene Beobachtungen), was durch *in-situ*-Hybridisierungs-Nachweise gestützt ist. Ausserdem führt eine Verringerung des Crk-mRNA-Levels durch das Einbringen von anti-sense mRNA im somatischen Mesoderm zu Defekten bei der Myogenese, die sich in Form von unfusionierten Myoblasten äußern.

Die Funktion von Crk ist in den letzten Jahren mit Hilfe von Zellkultur-Experimenten und biochemischen Ansätzen untersucht worden. So zeigte sich zum einen, dass Crk auf ein Src-Kinase vermitteltes Signal hin aus dem Cytoplasma zu Fokal-Adhäsionspunkten transportiert wird. Dabei spielt das LIM-Domänen-Protein Paxillin eine entscheidende Rolle (Lamorte et al., 2003; Li et al., 2002 und 2003). Dieses wird nachdem die Zelle über Integrine einen Kontakt zur Extrazellulären Matrix geknüpft hat durch eine Src-Kinase Tyrosin-Phosphoryliert. Dadurch entsteht ein Motiv, dass durch die SH2-Domäne von Crk erkannt und gebunden wird. Die LIM-Domäne von Paxillin sorgt dann für einen Transport des Komplexes aus Paxillin und Crk und gegebenenfalls weiteren an Crk-gebundenen Proteinen zur Zellmembran, und zwar an die Stelle des Fokalen Adhäsionskontaktes von dem das Signal ausging (Li et al., 2003). Einen Hinweis auf einen möglicherweise ähnlichen Mechanismus bei der somatischen Myoblastenfusion geben die beobachteten schweren Störungen im Mesoderm nach der Aktivierung der P-Element-Insertion im putativen Promotor-Bereich von Paxillin (19.3.3).

Zum anderen wurde gezeigt, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen Crk und der Abelson-Kinase besteht (Feller et al., 1992; Feller et al., 1994; Donaldson et al., 2002). Dabei handelt es sich um einen Feedback-Mechanismus, der sowohl die Aktivität der Abelson-Kinase als auch die Aktivität von Crk betrifft. So kann Crk über seine N-terminale SH3-Domäne mit einer Prolinreichen-Region von Abl interagieren, woraufhin die Kinase die Position Y221 von Crk Phosphoryliert, was letztlich zu einer Interaktion von Y221 mit der Crk-eigenen SH2-Domäne und einer Autoinhibition von Crk führt (Feller et al., 1992; Feller et al., 1994). Daneben erscheint jedoch Crk an einem positiven Feedback zur Aktivierung der Abelson-Kinase beteiligt. So ist die Abelsonkinase durch Wasserstoff-Brücken, die zwischen der SH2-Domäne und dem C-terminalen Loop gebildet werden autoinhibiert (Hantschel und Superti-Furga, 2004). In diesem Zustand ist eine basale Aktivität der Tyrosin-Kinase-Domäne möglich, die zur Phosphorylierung eines I/V/L-Y-x-x-P/F-Motives führen kann. Danach kann

das selbe Motiv durch die zuvor an den C-Terminus gebundene SH2-Domäne erkannt werden und als kompetitiver Bindepartner zur Aufhebung der Autoinhibition führen. Dieser Mechanismus wurde neben Crk auch für die Abelson-Substrate Jun, Abi, Nck, Paxillin, Cbl, γ -Pak, Cdk5, Enabled und Disabled beschrieben (Hantschel und Superti-Fuga, 2004). Während Ena, Cbl und Dab vermutlich nicht in die somatischen Myoblastenfusion involviert sind, da zum einen Dab nicht im somatischen Mesoderm exprimiert wird und zum anderen der Funktionsverlust von *ena* oder *Cbl* keine Auswirkung auf die Myoblastenfusion hat, ist von dem mit Kette interagierenden Protein Abi eine Beteiligung an der Myogenese bekannt (Bogdan, mündliche Mitteilung). Dabei wird Abi zum einen selbst durch die Abelson-Kinase phosphoryliert und dient zum anderen als Co-Faktor für die Aktivierung der Kinase (Juang und Hofmann, 1999).

22.3.2. Möglicherweise ist Blow an einem Feedback-Loop zur Aktivierung zytoplasmatischer Tyrosin-Kinasen beteiligt

Im Verlauf der *in-silico*-Analyse von Blown fuse wurde gezeigt, dass nicht nur Crk mit Blown fuse über die SH2- und SH3-Bindemotive interagieren kann, sondern auch verschiedene zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen und vor allem in Hinblick auf die Positionen Y342 und P325 die Kinasen der Src-Familie und die Abelsonkinase. Da Blown fuse nun zu dem T-Zell-Adaptor-Protein Skap-Hom ortholog ist, liegt es nahe, bei der Suche nach einem oder mehreren Tyrosin-Kinase-Partnern zunächst die Kinasen zu untersuchen, die in die Signaltransduktion der T-Zell-Synapse involviert sind. In Wirbeltieren existieren mindestens 11 verschiedene Familien zyto-

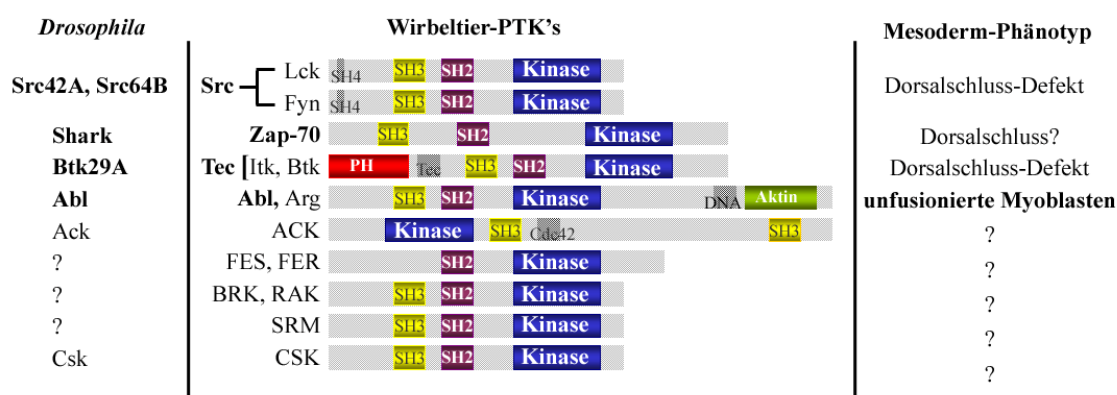


Abbildung 22.2.: SH2- und SH3-Domänen enthaltende zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen. verändert nach Kennedy et al., 1999

plasmatischer Tyrosin-Kinasen (Übersichtsartikel: Kennedy et al., 1999). Von diesen besitzen mindestens 9 neben der katalytischen Domäne entweder eine SH3- oder eine SH2- oder sowohl eine SH3- als auch eine SH2-Domäne. Den meisten ist darüberhinaus der Besitz einer regulatorischen Autophosphorylierungsstelle gemeinsam, die zur Selbstinhibition der Kinase genutzt wird. Von vielen dieser Kinasen, wenn auch nicht von allen, sind inzwischen homologe Proteine in *Drosophila* bekannt (Abb. 22.2). Sofern mutante Allele von diesen existieren und zugänglich sind, wurden diese Homologe auf eine mögliche Beteiligung an der Myogenese untersucht. Dazu wurde überprüft, ob ein Funktionsverlust zu Störungen der Myoblastenfusion führt (vgl. 19.3.1). Während die Kinasen der Src- und Tec-Familie bei Funktionsverlust vorwiegend Dorsalschluss-Defekte zeigen und darüberhinaus redundant wirken, konnten bei Funktionsverlust der Abelson-Kinase eindeutig Fusionsdefekte, sowie Fehler bei der Streckung und Anheftung der somatischen Muskeln festgestellt werden. Für das ZAP-70-Homolog Shark ist ebenfalls eine Beteiligung beim Dorsalschluss bekannt, in vorläufigen Untersuchungen wurden jedoch möglicherweise auch hier Fusionsdefekte beobachtet (Schröter, vorläufiges Ergebnis). Dies muss jedoch in weiterführenden Experimenten bestätigt und genauer untersucht werden. Ebenfalls zu zeigen wäre in weiterführenden Experimenten eine physikalische Interaktion zwischen Blown fuse und einer der Kinasen, wobei aufgrund der genannten Ergebnisse die Abelson-Kinase sicherlich der zunächst am interessantesten erscheinende Kandidat ist.

Es könnte hier wie auch für anderen Abelson-Substrate auch bei Blown fuse ein Feedback-Loop derart vorliegen, dass Y342 zunächst durch die basale Aktivität der autoinhibierten phosphoryliert und im Anschluss durch die SH2-Domäne der Abl-Kinase erkannt wird. Ebenso ist zwar eine Phosphorylierung durch eine Src-Kinase denkbar, da jedoch keine der untersuchten Src-Kinasen eine essentielle Rolle bei der Myoblastenfusion zu spielen scheint, wird dies als unwahrscheinlicher eingestuft. Mit Blick auf die oben diskutierte Interaktion mit Crk kann daher über folgendes Szenario spekuliert werden:

Auf ein bestimmtes Zell-Zell-Interaktionssignal hin, könnte Paxillin die Translokation eines im Zytoplasma gebildeten Komplexes aus Crk und Blow zum Fusionskomplex bewirken. Dabei interagiert Crk über seine SH2-Domäne mit Paxillin und über eine der SH3-Domänen, vorzugsweise der N-terminalen, mit Blown fuse an der Position P365. Gleichzeitig kommt es durch den über Y342 gesteuerten Feedback-

Mechanismus zur Aktivierung der Abelson-Kinase und in der Folge zur Aktivierung von Abi und so möglicherweise zur Aufhebung der cytoplasmatischen Inhibition von Scar/WAVE durch den Kette/Sra-1/Abi-Komplex. Dadurch wird schließlich ein fortschreitender Aufbau des Aktin-Zytoskelettes im Kontext des Fusionskomplexes gesteuert.

23. Molekulares Modell der somatischen Myoblastenfusion von *Drosophila melanogaster*: Das Adaptor-Protein Blown fuse/Skap-Hom/Scap2 und der Aktin-Regulator Kette/Hem2/Nap1 als Komponenten des Fusionskomplexes

Zusammenfassend führte die vorliegende Arbeit zu folgenden Ergebnissen:

- (1.) Die somatische Myoblastenfusion ist ein morphologisch zweistufiger Prozess, der im zweiten Schritt durch das Auftreten von Fusionskomplexen charakterisiert ist.
- (2.) Die dabei beobachteten Ultrastrukturen stimmen in Bezug auf den zweiten Fusionsschritt mit der Fusionskomplex-Theorie (Kesper et al., zur Veröffentlichung eingereicht) überein.
- (3.) Die Entwicklung der viszeralen Ringmuskeln des Mitteldarmes führt zu einer speziellen Muskelstruktur, die nicht mit einer Struktur bei den Wirbeltieren vergleichbar ist.
- (4.) Die somatische und die viszerale Myogenese haben Ähnlichkeiten bei der Etablierung des ersten Zell-Zell-Kontaktes und bei der Streckung bzw. Verankerung der Muskeln, sind aber ansonsten nicht vergleichbar.
- (5.) Blown fuse und Kette sind im zweiten somatischen Fusionsschritt essentiell für die Entwicklung des Fusionskomplexes. Dabei interagieren beide genetisch miteinander und Kette agiert downstream von Blow.
- (6.) Blown fuse und Kette sind für das Strecken und Verankern sowohl der somatischen als auch der zirkulären Mitteldarm-Muskeln notwendig. Auch eine Stabilisierung der die Netzform gestaltenden Strings durch Blow- bzw. Kette-abhängige Aktin-Polymerisation ist vorstellbar.
- (7.) Blown fuse ist homolog zu Skap-Hom/Skap-55R/Scap2, einem immunzell-spezifischen Adaptor-Protein.
- (8.) Das SH2-SH3-Domänen-Adaptor-Protein Crk dient möglicherweise als Verankerungs-Station für Blow, das seinerseits mit verschiedenen zytoplasmatischen Tyrosin-Kinasen wechselwirken könnte. Dabei erscheint vor allem die Abelson-Kinase als wahrscheinlicher Partner, da die bekannten Mitglieder sowohl der Src- als auch der Tec-Kinasen-Familie keine offensichtliche Beteiligung bei der Myoblastenfusion zeigen.

Insgesamt wird zum einen aufgrund der gefundenen Phänotypen und zum anderen aufgrund der unterschiedlichen Beteiligung von z.B. Dock und den Src-Kinasen sowie der differentiellen Expression von Blown fuse und z.B. der Interaktion der im somatischen Mesoderm während der Fusionsstadien nicht koexprimierten Proteine Blow und Rols7 von mindestens zwei verschiedenen während der Myogenese ablaufenden molekularen Signalwegen ausgegangen. Diese stimmen jedoch in der Verwendung verschiedener molekularer Komponenten überein, so sind z.B. Blow, Kette und Rols7 sowohl an der Myoblastenfusion als auch an der Anheftung der Muskeln und der Myofibrillogenese beteiligt. Während auf der einen Seite das Strecken und Anheften der somatischen und der viszerale Muskeln vermutlich dem axonalen Wachstum in der Neurogenese ähnlich sind, wird auf der anderen Seite bei der somatischen Myoblastenfusion ein Signalweg eingeschlagen, der dem Signalweg bei der Kontaktetablierung der monozentrischen Immunologischen Synapse vergleichbar ist. Dieser soll im Folgenden knapp erläutert werden.

23.1. Blow ist für die Initiation der Plaquebildung und die Stabilisierung der Rezeptorclusterung verantwortlich, was vergleichbar der Rolle von Skap-55R/Skap-Hom/Scap-2 bei der Bildung des pSMAC ist

Nachdem bei der zweiten somatischen Fusion der initiale Zell-Zell-Kontakt durch die heterophile Interaktion zwischen Duf und Sns hergestellt wurde, wird eine Kontaktstruktur, die der monozentrischen Immunologischen Synapse ähnlich ist, etabliert. Dabei spielen sich in der fusionskompetenten Myoblaste und in der Muskelvorläufer-Zelle unterschiedliche Signalwege ab, wobei die fusionskompetente Myoblaste mit der T-Zelle und die Muskelvorläufer-Zelle mit der AP-Zelle der Immunologischen Synapse verglichen werden kann. Blown fuse agiert dabei in den fusionskompetenten Myoblasten, analog zu Skap-55R/Skap-Hom/Scap2 in den T-Zellen. Während in der T-Zelle das Interaktionssignal wie oben beschrieben über Fyn und ADAP an Skap-55R/Skap-Hom/Scap2 weiter geleitet wird, was zum einen zur Aktivierung kleiner GTPasen und zur Polarisierung des Aktin-Zytoskelettes, zum anderen zur Aktivierung von LFA-1 und so zum Auf- und Ausbau des pSMAC führt, ist in der Myoblastenfusion noch unklar, wie das Signal von Sns in die Kaskade weitergeleitet wird. Eine direkte Interaktion von Blow mit Sns erscheint jedoch aufgrund der mole-

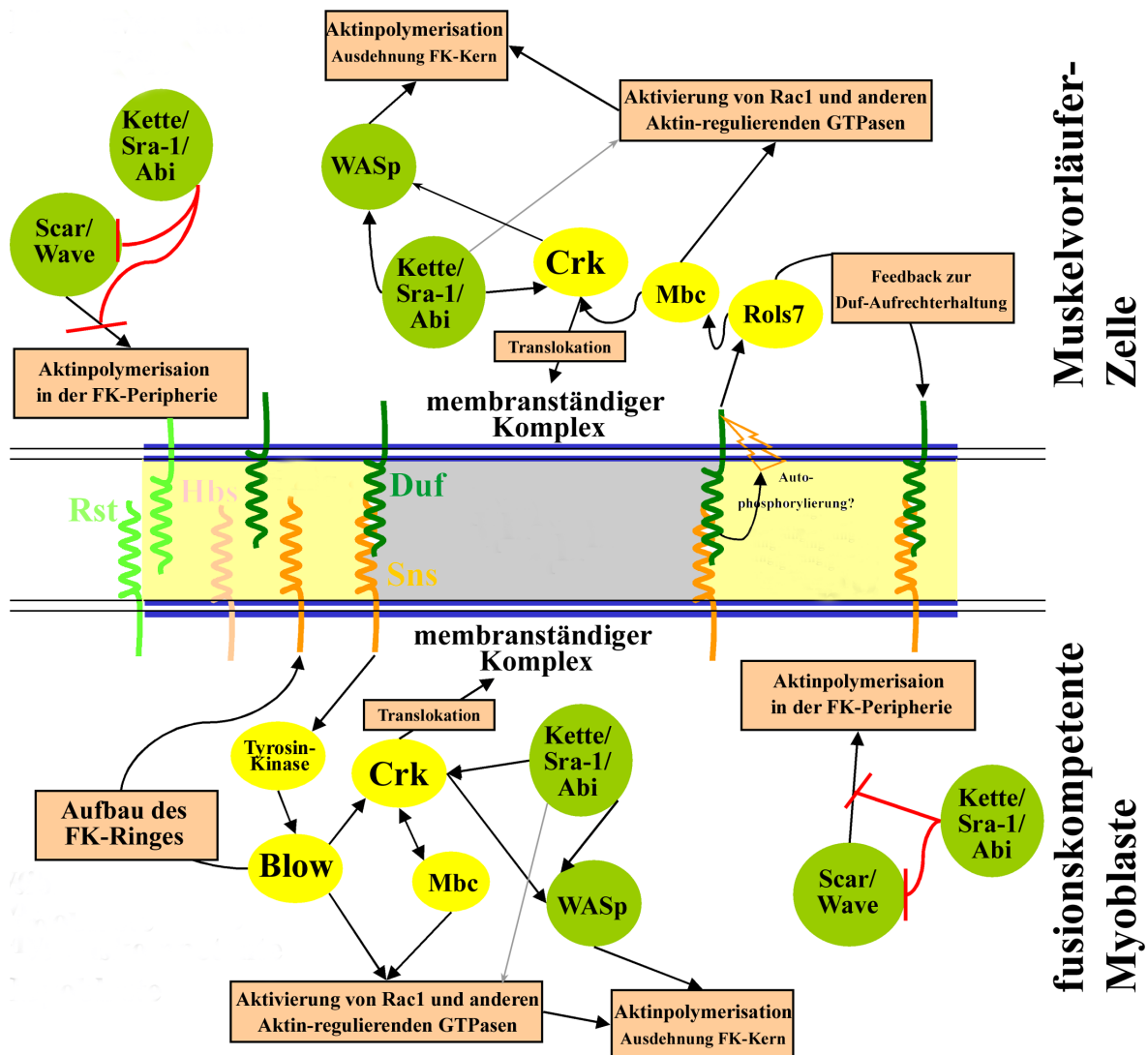


Abbildung 23.1.: Molekulares Modell des Fusionskomplexes im zweiten Fusions-schritt. FK = Fusionskomplex. Gelb = Ring des Fusionskomplexes, grau = Kern des Fusionskomplexes.

kularen Struktur von Blow unwahrscheinlich. Vielmehr wird vermutlich auch hier das Signal auf eine zytoplasmatische Tyrosin-Kinase übertragen, was zur Phosphorylierung von Blown fuse führt. In der Folge kommt es zur Translokation des Proteins zur Kontaktstelle, möglicherweise vermittelt durch Crk und Paxillin. Dort kann Blow als GTPase-Effektor den sich bildenden Aktin-Kern, der vergleichbar mit dem cSMAC ist, unterstützen. Das Protein kann jedoch nicht an der initialen Bildung des Aktin-Kernes beteiligt sein, da dieser Schritt in Funktionsverlustmutanten korrekt abläuft. Die Beobachtung, dass in *blow*-mutanten Embryonen der Präfusionskomplex aus paarig angeordneten elektronendichten Vesikeln gebildet wird, stützt dies, und eben dieser Präfusionskomplex kann in Übereinstimmung mit der Fusionskomplex-Theorie

nicht nur mit dem Kern der Podosomen, sondern auch mit dem cSMAC der monozentrischen Immunologischen Synapse verglichen werden. Die eigentliche Funktion von Blow wird daher, entsprechend der Funktion von Skap-55R/Skap-Hom/Scap2, bei der Bildung einer pSMAC-ähnlichen Struktur gesehen. Dabei sind die molekularen Komponenten, die den cSMAC-Aktin-Kern ringförmig umgeben jedoch immer noch unbekannt. Es kann zwar vermutet werden, dass dabei auf Seiten der fusionskompetenten Myoblasten zumindest Sns einen Bestandteil des Ringes darstellt, Klarheit darüber kann aber letztlich nur durch die technisch äusserst aufwendige Auswertung immunhistologischer Nachweise im Transmissions-Elektronenmikroskop gewonnen werden. Dabei muss nach Komponenten gesucht werden, die im Bereich der elektronendichten Vesikel des Präfusionskomplexes, die vermutlich das subzelluläre Bild des pSMAC darstellen, lokalisiert sind und deren Regulation möglicherweise von einem downstream von Blown fuse agierenden Transkriptionsfaktor abhängig ist. Geeignete Kandidaten dafür könnten z. B. mit Hilfe eines Micro-Array-Screens selektiert werden. Der Vergleich des pSMAC mit dem sich ausdehnenden Präfusionskomplex wird weiterhin dadurch gestützt, dass der dafür notwendige Vesikeltransport mit großer Wahrscheinlichkeit eine intakte Formation des Microtubuli-Zytoskelettes voraussetzt. Von diesem ist wiederum eine Rolle bei der Stabilisierung des pSMAC bekannt (Kinashi, 2005). Darüberhinaus sind im Bereich der den cSMAC repräsentierenden elektronendichten Plaques in manchen Fällen dünne Zytoskelett-Faserreste im Transmissions-Elektronenmikroskop erkennbar, bei denen es sich vermutlich um filamentäres Aktin handelt, was wiederum in Einklang mit der Organisation einer monozentrischen Immunologischen Synapse steht.

23.2. Kette wird für die geregelte Erweiterung des Fusionskomplexes benötigt

Im Gegensatz zu Blown fuse ist Kette sowohl in den Muskelvorläufer-Zellen als auch in den fusionskompetenten Myoblasten aktiv. Seine Funktion bezüglich des Fusionskomplexes, wird in der geregelten Ausdehnung des Komplexes gesehen. Dabei kann man sich vorstellen, dass die Ausdehnung quasi von innenheraus erfolgt, in dem sich der dem cSMAC vergleichbare Aktin-Kern durch progressive Aktinpolymerisation kontinuierlich nach aussen ausdehnt und dabei den pSMAC-vergleichbaren Ring des Fusionskomplexes quasi auseinander drückt. Dieser ist dadurch gezwungen, mit dem

sich ausdehnenden inneren Kern kontinuierlich mitzuwachsen. Dies geschieht, indem in Abhängigkeit von Blown fuse von aussen neues Material angelagert wird. Dabei ist zum einen die inhibitorische Funktion, die der Kette/Sra-1/Abi-Komplex auf zytoplasmatisches Scar/WAVE ausübt wichtig, da dadurch verhindert wird, dass sich an der Aussenseite des pSMAC Aktin-Filamente anlagern und so dessen Ausdehnung verhindern können. Gleichzeitig ist vorstellbar, dass durch die membranständige Aktivierung von WASp, die ebenfalls durch den Kette/Sra-1/Abi-Komplex erfolgt, die Ausdehnung des inneren Aktin-Kernes gesteuert wird. Dabei ist jedoch zu fordern, dass sich im Kern des Fusionskomplexes Adaptor-Proteine befinden, die die Verankerung des Kette/Sra-1/Abi-Komplexes ermöglichen, aber gleichzeitig in der äusseren Umgebung des Fusionskomplex-Ringes nicht vorkommen. Da von Dreadlocks, das diesen Prozess bei der Axonogenese und vermutlich auch beim Strecken und Anheften der Muskeln steuert, keine Beteiligung an der somatischen Myoblastenfusion bekannt ist, muss nach anderen SH2-SH3-Adaptor-Proteinen gesucht werden. In Frage kommen dafür zunächst Crk und Grb2, wobei eine diesbezügliche Funktion von Crk als wahrscheinlicher angesehen wird, da auch für Grb2 eine mesodermale Funktion unklar ist. Der Translokationsmechanismus dieser Adaptorproteine zur Fusionstelle muss noch geklärt werden. Zwar ist auch hier eine Kaskade, die von einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase abhängig ist und über Crk und Paxillin verläuft vorstellbar, es könnte aber auch sein, dass Duf durch seine Autophosphorylierungs-Domäne eine Rolle spielt, die einer Rezeptortyrosinkinase bei der Axonogenese vergleichbar ist.

23.3. Fazit - Die somatischen Myoblastenfusion von *Drosophila melanogaster* ist von mindestens zwei unterschiedlichen, in den Foundern-/Muskelvorläufer-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten parallel ablaufenden molekularen Mechanismen abhängig

Abschließend lassen sich die aus der vorliegenden Arbeit und der bisher veröffentlichten Literatur gewonnenen Erkenntnisse modellhaft zu folgendem Ablauf der somatischen Myoblastenfusion zusammenfassen:

Nach der Determination der Founder-Zellen kommt es zum Zell-Zell-Kontakt und zum ersten Fusionsschritt zwischen der jeweiligen Founder-Zelle und zwei bis drei unmittelbar benachbarten fusionskompetenten Myoblasten. Der zweite Fusionsschritt

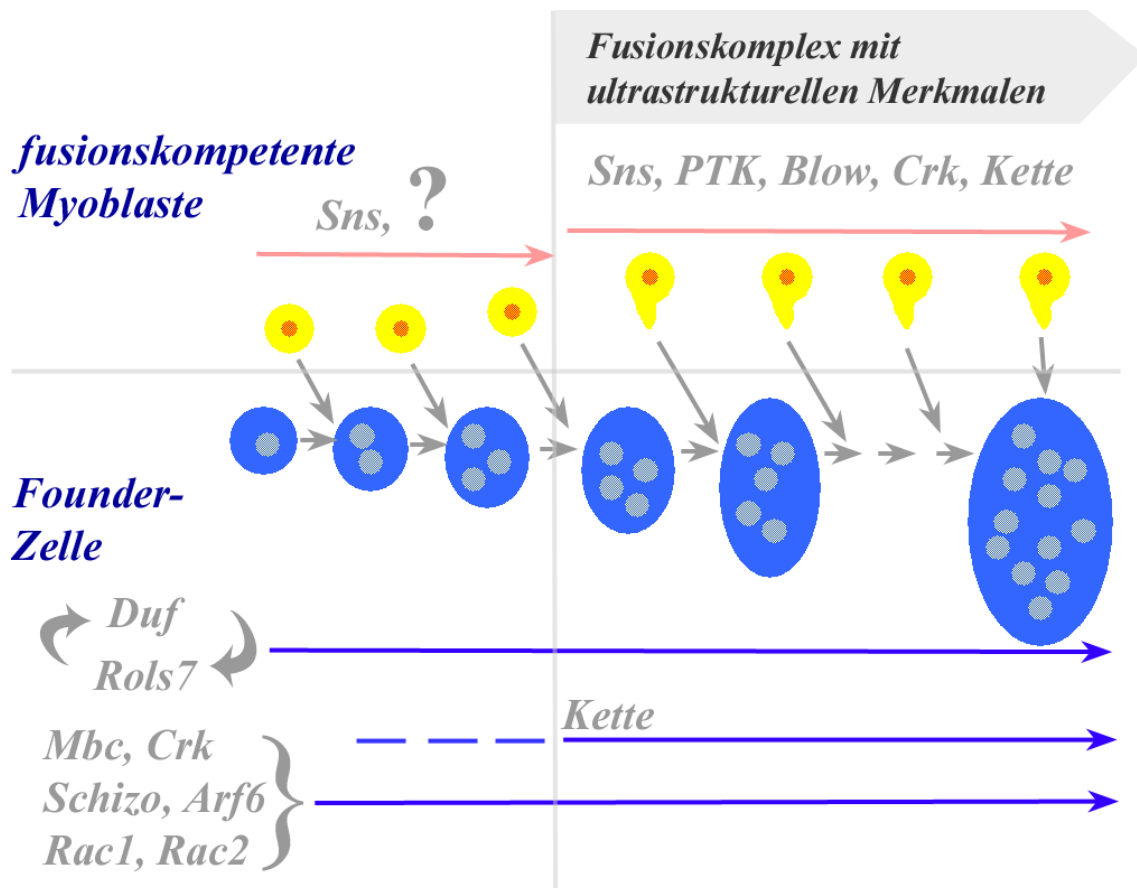


Abbildung 23.2.: Die somatischen Myoblastenfusion wird auf Seiten der Founder-Zelle durch einen molekularen Countdown, auf Seiten der fusionskompetenten Myoblasten durch die Initiation des Fusionskomplexes gesteuert.

erfolgt zwischen der Muskelvorläufer-Zelle und weiter entfernten fusionskompetenten Myoblasten. Diese sind daher gezwungen, Filopodien in Richtung der Muskelvorläufer auszustrecken und bei Kontakt eine so intensive Adhäsionsstruktur zu bilden, dass der Kontakt auch beim Heranziehen des Zellkörpers nicht verloren geht. Diese lässt sich in Form der beschriebenen Ultrastrukturen mit Hilfe des TEM beobachten.

Auf der molekularen Ebene laufen in der Founder- bzw. Muskelvorläufer-Zelle und den fusionskompetenten Myoblasten zwei völlig unterschiedliche Mechanismen ab. Während die Founder- und Muskelvorläufer-Zelle dabei der eher passiven Antigen-Präsentierenden-Zelle bei der Etablierung der Immunologischen Synapse vergleichbar ist, übernehmen die fusionskompetenten Myoblasten im zweiten Fusionsschritt die Rolle der aktiven T-Zelle. So reagieren die Founder- bzw. Muskelvorläuferzellen auf den erfolgten heterophilen Duf-Sns-Kontakt einerseits mit einer Rols7-abhängigen Feedback-Schleife, die die Aufrechterhaltung des Duf-Levels gewährleistet. An-

dererseits kann es durch eine mögliche Autophosphorylierung von Duf zur Crk-vermittelten Translokation der von Mbc und Rac1 abhängigen Aktin-Maschinerie zur Fusionsstelle kommen. Darin involviert sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Schizo/Loner und Arf6, welche Komponenten jedoch letztlich den Membranzusammenbruch bewirken ist noch unklar. Beide molekularen Prozesse, die Aufrechterhaltung des Duf-Levels und die Translokation der Aktin-Maschinerie zur Fusionstelle laufen jedoch während der gesamten Myoblastenfusion, also zunächst im ersten Fusionsschritt innerhalb der Founder-Zellen und dann im zweiten Fusionsschritt innerhalb der Muskelvorläufer-Zellen, identisch ab.

Während die Mechanismen, die im ersten Fusionsschritt innerhalb der fusionskompetenten Myoblasten ablaufen, völlig unklar sind, ist der zweite Fusionsschritt in der oben beschriebenen Art und Weise (23.1) von Blown fuse abhängig. Eine Aufrechterhaltung der Sns-Expression über die Fusion hinaus ist hier nicht notwendig, vielmehr kommt es zur Reprogrammierung des Zellkernes. Dieser muss nach der Fusion das Founder-Zellen-Programm abspielen, bis die finale Muskelgröße erreicht ist. Es ist unklar, wie festgelegt ist, wann der jeweilige Muskelvorläufer die Fusionen einstellt, ein molekularer Zählmechanismus, der von der Duf-Rols7-Kaskade sowie den muskelspezifischen identitätsvermittelnden Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Krüppel und Evenskipped, abhängig ist, ist jedoch vorstellbar.

Auf diese Weise laufen vor dem Hintergrund der morphologisch zweistufig erscheinenden somatischen Fusion zwei verschiedene molekulare Mechanismen ab: In den Founder- bzw. Muskelvorläufer-Zellen finden unter einem kontinuierlichem Countdown alle Fusionen in Abhängigkeit von Mbc, Rac1, Schizo/Loner und Arf6, begleitet von der durch Rols7 aufrechtgehaltenen Duf-Expression, statt. In den fusionskompetenten Myoblasten erfolgen die Fusionen, die mit einer unmittelbar benachbarten Founder-Zelle stattfinden und daher zum ersten Fusionsschritt gezählt werden, durch einen unbekannten Mechanismus. Ab dem zweiten Fusionsschritt, der die Bildung von Filopodien und die dadurch vermittelte Migration der fusionskompetenten Myoblaste zur Muskelvorläufer-Zelle erfordert, wird in Abhängigkeit von Blown fuse ein Fusionskomplex etabliert, der den initialen Zell-Zell-Kontakt stabilisiert und ausbaut. Dieser Kontakt wird schließlich sowohl in den fusionskompetenten Myoblasten als auch in den Muskelvorläufer-Zellen in Abhängigkeit von Kette so lange erweitert (23.2), bis es unter Einwirkung bisher unbekannter Faktoren zum Membranzusammenbruch und daher zur Fusion kommt.

Literaturverzeichnis

- Abmayr, S., Balagopalan, L., Galletta, B., and Hong, S. (2003). Cell and molecular biology of myoblast fusion. *Int Rev Cytol*, 225:33–89.
- Abmayr, S. and Keller, C. (1998). *Drosophila* myogenesis and insights into the role of nautilus. *Curr Top Dev Biol*, 38:35–80.
- Abram, C., Seals, D., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T., and Courtneidge, S. (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem*, 278(19).
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3):403–10.
- Artero, R., Castanon, I., and Baylies, M. (2001). The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development*, 128(21):4251–64.
- Artero, R., Furlong, E., Beckett, K., Scott, M., and Baylies, M. (2003). Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cells during *Drosophila* myogenesis. *Development*, 130(25):6257–72.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J., Smith, J. A., and Struhl, K., editors (1993). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Azpiazu, N. and Frasch, M. (1993). *tinman* and *bagpipe*: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev*, 7(7B):1325–40.
- Azpiazu, N., Lawrence, P., Vincent, J., and Frasch, M. (1996). Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev*, 10(24):3183–94.
- Badour, K., Zhang, J., Shi, F., McGavin, M., Rampersad, V., Hardy, L., Field, D., and Siminovitch, K. (2003). The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity*, 18.
- Baker, R. and Schubiger, G. (1995). Ectoderm induces muscle-specific gene expression in *Drosophila* embryos. *Development*, 121(5):1387–98.
- Balla, T. and Varnai, P. (2002). Visualizing cellular phosphoinositide pools with gfp-fused protein-modules. *Sci STKE*, 2002(125):PL3.
- Bate, M. (1993). *The mesoderm and its derivatives; in: The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

-
- Baumgartner, S., Martin, D., Chiquet-Ehrismann, R., Sutton, J., Desai, A., Huang, I., Kato, K., and Hromas, R. (1995). The HEM proteins: a novel family of tissue-specific transmembrane proteins expressed from invertebrates through mammals with an essential function in oogenesis. *J Mol Biol*, 251.
- Baylies, M. and Bate, M. (1996). *twist*: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science*, 272(5267):1481–4.
- Baylies, M., Bate, M., and Ruiz Gomez, M. (1998). Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell*, 93(6):921–7.
- Beiman, M., Shilo, B., and Volk, T. (1996). Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev*, 10(23):2993–3002.
- Bennett, R. and Hoffmann, F. (1992). Increased levels of the *Drosophila* Abelson tyrosine kinase in nerves and muscles: subcellular localization and mutant phenotypes imply a role in cell-cell interactions. *Development*, 116(4):953–66.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Res*, 7(69):1513–1523.
- Blake, J. D. and Cohen, F. E. (1986). Pairwise sequence alignment below the twilight zone. *J Mol Biol*, 307(2):721–35.
- Blobel, C., Wolfsberg, T., Turck, C., Myles, D., Primakoff, P., and White, J. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, 356(6366):248–52.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*, 294(5):1351–62.
- Blumenthal, R., Clague, M., Durell, S., and Epan, R. (2003). Membrane fusion. *Chem Rev*, 103(1):53–69.
- Bock, J., Matern, H., Peden, A., and Scheller, R. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*, 409(6822):839–41.
- Bodenstein, D. (1950). The postembryonic development of *Drosophila*. In Demerec, M., editor, *Biology of Drosophila*. Hafner, New York.
- Bodmer, R. (1993). The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development*, 118(3):719–29.
- Bogdan, S., Grewe, O., Strunk, M., Mertens, A., and Klambt, C. (2004). Sra-1 interacts with Kette and Wasp and is required for neuronal and bristle development in *Drosophila*. *Development*, 131(16):3981–9.
- Bogdan, S. and Klambt, C. (2003). Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp. *Development*, 130(18):4427–37.
- Bogdan, S., Stephan, R., Lobke, C., Mertens, A., and Klambt, C. (2005). Abi activates WASP to promote sensory organ development. *Nat Cell Biol*, 7(10):977–84.

- Bonneau, R., Strauss, C., Rohl, C., Chivian, D., Bradley, P., Malmstrom, L., Robertson, T., and Baker, D. (2002). De novo prediction of three-dimensional structures for major protein families. *J Mol Biol*, 322(1):65–78.
- Bonneau, R., Tsai, J., Ruczinski, I., Chivian, D., Rohl, C., Strauss, C., and Baker, D. (2001). Rosetta in CASP4: progress in *ab initio* protein structure prediction. *Proteins*, Suppl 5:119–26.
- Bour, B., Chakravarti, M., West, J., and Abmayr, S. (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev*, 14(12):1498–511.
- Bour, B., O’Brien, M., Lockwood, W., Goldstein, E., Bodmer, R., Taghert, P., Abmayr, S., and Nguyen, H. (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev*, 9(6):730–41.
- Brown, N. (1994). Null mutations in the alpha PS2 and beta PS integrin subunit genes have distinct phenotypes. *Development*, 120(5):1221–31.
- Brown, N., Gregory, S., and Martin-Bermudo, M. (2000). Integrins as mediators of morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol*, 223(1):1–16.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S., Tosello-Tramont, A., Macara, I., Madhani, H., Fink, G., and Ravichandran, K. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol*.
- Bystroff, C., Simons, K., Han, K., and Baker, D. (1996). Local sequence-structure correlations in proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 7(4):417–21.
- Carmena, A., Bate, M., and Jimenez, F. (1995). Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev*, 9(19):2373–83.
- Carmena, A., Buff, E., Halfon, M., Gisselbrecht, S., Jimenez, F., Baylies, M., and Michelson, A. (2002). Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev Biol*, 244(2):226–42.
- Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F., and Michelson, A. (1998). Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev*, 12(24):3910–22.
- Chapman, R. F. (1999). *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C., and Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, 384(6608):481–4.
- Chavrier, P. and Goud, B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, 11(4):466–75.

-
- Chen, E. and Olson, E. (2001). Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell*, 1(5):705–15.
- Chen, E. and Olson, E. (2004). Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *Drosophila*. *Trends Cell Biol*, 14(8):452–60.
- Chen, E. and Olson, E. (2005). Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science*, 308(5720):369–73.
- Chen, E., Pryce, B., Tzeng, J., Gonzalez, G., and Olson, E. (2003). Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6. *Cell*, 114(6):751–62.
- Chen, R. and Jeong, S. (2000). Functional prediction: identification of protein orthologs and paralogs. *Protein Sci*, 9(12):2344–53.
- Chernomordik, L., Melikyan, G., and Chizmadzhev, Y. (1987). Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 906(3):309–52.
- Chothia, C. and Lesk, A. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*, 5(4):823–6.
- Chothia, C. and Lesk, A. M. (1987). The evolution of protein structures. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 52:399–405.
- Cooper, E. (2001). A new role for ion channels in myoblast fusion. *J Cell Biol*, 153(4):F9–12.
- Cote, J. and Vuori, K. (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci*, 115(Pt 24):4901–13.
- Crouse, J. and Amorese, D. (1987). Ethanol precipitation: ammonium acetat as an alternative to sodium acetat. *FOCUS*, pages 3–5.
- Curtis, J., Wolber, F., Sonstein, J., Craig, R., Polak, T., Knibbs, R., Todt, J., Seitzman, G., and Stoolman, L. (2000). Lymphocyte-endothelial cell adhesive interactions in lung immunity: lessons from the murine response to particulate antigen. *Immunopharmacology*.
- del Campo, J., Opoku-Serebuoh, E., Isaacson, A., Scranton, V., Tucker, M., Han, M., and Mohler, W. (2005). Fusogenic activity of EFF-1 is regulated via dynamic localization in fusing somatic cells of *C. elegans*. *Curr Biol*, 15(5):413–23.
- Dettner, K und Petersen, W., editor (2003). *Lehrbuch der Entomologie*. Spektrum Akademische Verlag, Gustav Fischer.
- Doberstein, S., Fetter, R., Mehta, A., and Goodman, C. (1997). Genetic analysis of myoblast fusion: *blown fuse* is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol*, 136(6):1249–61.

- Dohrmann, C., Azpiazu, N., and Frasch, M. (1990). A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Genes Dev*, 4(12A):2098–111.
- Donaldson, J. and Jackson, C. (2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, 12(4):475–82.
- Donaldson, L., Gish, G., Pawson, T., Kay, L., and Forman-Kay, J. (2002). Structure of a regulatory complex involving the Abl SH3 domain, the Crk SH2 domain, and a Crk-derived phosphopeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22):14053–8.
- Donnadieu, E., Cefai, D., Tan, Y., Paresys, G., Bismuth, G., and Trautmann, A. (1992). Imaging early steps of human T cell activation by antigen-presenting cells. *J Immunol*, 148(9):2643–53.
- Duan, H., Skeath, J., and Nguyen, H. (2001). *Drosophila* *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development*, 128(22):4489–500.
- Duan, Y. and Kollman, P. A. (1998). Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution. *Science*, 282(5389):740–4.
- Dustin, M., Bromley, S., Kan, Z., Peterson, D., and Unanue, E. (1997). Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8):3909–13.
- Dworak, H., Charles, M., Pellerano, L., and Sink, H. (2001). Characterization of *Drosophila hibris*, a gene related to human nephrin. *Development*, 128(21):4265–76.
- Dworak, H. and Sink, H. (2002). Myoblast fusion in *Drosophila*. *Bioessays*, 24(7):591–601.
- Eckert, D. and Kim, P. (2001). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*, 70:777–810.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Kirschner, M. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, 418(6899):790–3.
- Elder, H. Y. (1975). Muscle structure. In Usherwood, P. N. R., editor, *Insect muscle*. Academic Press, New York.
- Englund, C., Loren, C., Grabbe, C., Varshney, G., Deleuil, F., Hallberg, B., and Palmer, R. (2003). Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion. *Nature*, 425(6957):512–6.
- Erickson, M., Galletta, B., and Abmayr, S. (1997). *Drosophila myoblast city* encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol*, 138(3):589–603.

- Feller, S. (2001). Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene*, 20(44):6348–71.
- Feller, S., Knudsen, B., and Hanafusa, H. (1995). Cellular proteins binding to the first Src homology 3 (SH3) domain of the proto-oncogene product c-Crk indicate Crk-specific signaling pathways. *Oncogene*, 10(8):1465–73.
- Feller, S., Ren, R., Hanafusa, H., and Baltimore, D. (1994). SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem Sci*, 19(11):453–8.
- Fogerty, F., Juang, J., Petersen, J., Clark, M., Hoffmann, F., and Mosher, D. (1999). Dominant effects of the *bcr-abl* oncogene on *Drosophila* morphogenesis. *Oncogene*, 18(1):219–32.
- Franke, T., Kaplan, D., Cantley, L., and Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*, 275(5300):665–8.
- Frasch, M. (1995). Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature*, 374(6521):464–7.
- Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H., and Levine, M. (1987). Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *EMBO J*, 6(3):749–59.
- Frasch, M. and Leptin, M. (2000). Mergers and acquisitions: unequal partnerships in *Drosophila* myoblast fusion. *Cell*, 102(2):127–9.
- Frech, M., Andjelkovic, M., Ingley, E., Reddy, K., Falck, J., and Hemmings, B. (1997). High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem*, 272(13):8474–81.
- Frech, M., Ingley, E., Andjelkovic, M., and Hemmings, B. (1995). Pleckstrin homology domains. *Biochem Soc Trans*, 23(3):616–8.
- Freiberg, B., Kupfer, H., Maslanik, W., Delli, J., Kappler, J., Zaller, D., and Kupfer, A. (2002). Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol*, 3(10):911–7.
- Friedl, P., den Boer, A., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*, 5(7):532–45.
- Friedl, P. and Storim, J. (2004). Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse. *Trends Cell Biol*, 14(10):557–67.
- Galletta, B., Niu, X., Erickson, M., and Abmayr, S. (1999). Identification of a *Drosophila* homologue to vertebrate Crk by interaction with MBC. *Gene*, 228(1-2):243–52.
- Gassen, H. G. and Schrimpf, G., editors (1999). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R., and Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3784–8.
- Gaul, U., Seifert, E., Schuh, R., and Jackle, H. (1987). Analysis of Kruppel protein distribution during early *Drosophila* development reveals posttranscriptional regulation. *Cell*, 50(4):639–47.
- Georgias, C., Wasser, M., and Hinz, U. (1997). A basic-helix-loop-helix protein expressed in precursors of *Drosophila* longitudinal visceral muscles. *Mech Dev*, 69(1-2):115–24.
- Giebel, B. (1999). The Notch signaling pathway is required to specify muscle progenitor cells in *Drosophila*. *Mech Dev*, 86(1-2):137–45.
- Gilula, N. B. (1974). Junctions between cells. In Cox, R. P., editor, *Cell communication*. Wiley, New York.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J., Doe, C., and Michelson, A. (1996). *heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*, 10(23):3003–17.
- Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D., Kular, G., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J., and De Matteis, M. (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol*, (6):393–404.
- Goldstein, M. and Burdette, W. (1971). Striated visceral muscle of *Drosophila melanogaster*. *J Morphol*, 134(3):315–34.
- Grakoui, A., Bromley, S., Sumen, C., Davis, M., Shaw, A., Allen, P., and Dustin, M. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285(5425):221–7.
- Grumbling, G. and Strelets, V. (2006). FlyBase: anatomical data, images and queries. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue):D484–8.
- Gumienny, T., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A., Kinchen, J., Haney, L., Nishiwaki, K., Walk, S., Nemergut, M., Macara, I., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., and Van Aelst, L. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*, (107):27–41.
- Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, K., Brocker, E., Kampgen, E., and Friedl, P. (2000). Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity*, 13(3).
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279(5350):509–14.

- Hamasaki, K., Mimura, T., Morino, N., Furuya, H., Nakamoto, T., Aizawa, S., Morimoto, C., Yazaki, Y., Hirai, H., and Nojima, Y. (1996). Src kinase plays an essential role in integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate p130Cas. *Biochem Biophys Res Commun*, (222):338–343.
- Hansmann, U. and Okamoto, Y. (1999). New Monte Carlo algorithms for protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, 9(2):177–83.
- Hantschel, O. and Superti-Furga, G. (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(1):33–44.
- Harbow, E. and D, L., editors (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T., and Matsuda, M. (1996). DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol*, 16(4).
- Hayes, S., Miller, J., and Hoshizaki, D. (2001). serpent, a GATA-like transcription factor gene, induces fat-cell development in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 128(7):1193–200.
- Heinz, F. and Allison, S. (2001). The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol*, 4(4):450–5.
- Heitzler, P., Coulson, D., Saenz-Robles, M., Ashburner, M., Roote, J., Simpson, P., and Gubb, D. (1993). Genetic and cytogenetic analysis of the 43A-E region containing the segment polarity gene costa and the cellular polarity genes prickle and spiny-legs in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 135(1).
- Higgs, H. and Pollard, T. (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem*, 70:649–76.
- Hofmann, K. (1998). Protein classification and functional assignment. In Patterson, M. and Handel, M., editors, *Trends guide to bioinformatics*. Elsevier Science.
- Horsley, V., Friday, B., Matteson, S., Kegley, K., Gephart, J., and Pavlath, G. (2001). Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. *J Cell Biol*, 153(2):329–38.
- Horsley, V., Jansen, K., Mills, S., and Pavlath, G. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell*, 113(4):483–94.
- Horsley, V. and Pavlath, G. (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol*, 156(5):771–4.
- Horsley, V. and Pavlath, G. (2004). Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs*, 176(1-3):67–78.
- Hourai, Y., Akutsu, T., and Akiyama, Y. (2004). Optimizing substitution matrices by separating score distributions. *Bioinformatics*, 20(6):863–73.

- Hummel, T., Leifker, K., and Klamt, C. (2000). The *Drosophila* HEM-2/NAP1 homolog KETTE controls axonal pathfinding and cytoskeletal organization. *Genes Dev*, 14(7):863–73.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K., and Klamt, C. (1999). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Development*, 126(4):771–9.
- Huovila, A., Almeida, E., and White, J. (1996). ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol*, 8(5):692–9.
- Huppa, J., Gleimer, M., Sumen, C., and Davis, M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat Immunol*, 4(8):749–55.
- Hvidsten, T., Kryshchuk, A., Komorowski, J., and Fidelis, K. (2003). A novel approach to fold recognition using sequence-derived properties from sets of structurally similar local fragments of proteins. *Bioinformatics*, 19 Suppl 2:II81–II91.
- Ip, Y., Park, R., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., and Levine, M. (1992). Dorsal-Twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*, 6(8):1518–30.
- Jacobelli, J., Andres, P., Boisvert, J., and Krummel, M. (2004). New views of the immunological synapse: variations in assembly and function. *Curr Opin Immunol*, 16(3):345–52.
- Jaffe, A., Aspenstrom, P., and Hall, A. (2004). Human CNK1 acts as a scaffold protein, linking Rho and Ras signal transduction pathways. *Mol Cell Biol*, 24(4):1736–46.
- Jagla, K., Frasch, M., Jagla, T., Dretzen, G., Bellard, F., and Bellard, M. (1997). *ladybird*, a new component of the cardiogenic pathway in *Drosophila* required for diversification of heart precursors. *Development*, 124(18):3471–9.
- Jagla, T., Bellard, F., Lutz, Y., Dretzen, G., Bellard, M., and Jagla, K. (1998). *ladybird* determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. *Development*, 125(18):3699–708.
- Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T. (2003). Membrane fusion. *Cell*, 112(4):519–33.
- Jahn, R. and Sudhof, T. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem*, 68:863–911.
- Jo, E., Wang, H., and Rudd, C. (2005). An essential role for SKAP-55 in LFA-1 clustering on T cells that cannot be substituted by SKAP-55R. *J Exp Med*, 201(11):1733–9.
- Johansson, M., Lye, M., Barthel, S., Duffy, A., Annis, D., and Mosher, D. (2004). Eosinophils adhere to vascular cell adhesion molecule-1 via podosomes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31(4):413–22.
- Juang, J. and Hoffmann, F. (1999). *Drosophila* Abelson interacting protein (dAbi) is a positive regulator of Abelson tyrosine kinase activity. *Oncogene*, 18(37):5138–47.

- Kennedy, J., Raab, M., and Rudd, C. (1999). Signaling scaffolds in immune cells. *Cell Calcium*, 26(5):227–35.
- Kesper, D. (2005). *Die Analyse der cis-Regulation des rols-Gens und die Beteiligung von Rols7 am Aufbau eines podosomenähnlichen adhäsiven Komplexes (PIL-MAC), der eine zentrale Rolle in der Myoblastenfusion bei Drosophila melanogaster einnimmt*. PhD thesis, Philipps-Universität Marburg.
- Kesper, D., Stute, C., Buttgereit, D., Kreisköther, N., Vishnu, S., Fischbach, K.-F., and Renkawitz-Pohl, R. Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion restricting myogenic-adhesive complex (furmac).
- Kim, O., Yang, J., and Qiu, Y. (2002). Selective activation of small GTPase RhoA by tyrosine kinase Etk through its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*, 277(33):30066–71.
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., and Matsuda, M. (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev*, 12(21):3331–6.
- Klapper, R. (2000). The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mech Dev*, 95(1-2):47–54.
- Klapper, R., Heuser, S., Strasser, T., and Janning, W. (2001). A new approach reveals syncytia within the visceral musculature of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 128(13):2517–24.
- Klapper, R., Stute, C., Schomaker, O., Strasser, T., Janning, W., Renkawitz-Pohl, R., and Holz, A. (2002). The formation of syncytia within the visceral musculature of the *Drosophila* midgut is dependent on *duf*, *sns* and *mbc*. *Mech Dev*, 110(1-2):85–96.
- Knudsen, K. A. (1992). Fusion of myoblasts. In Wilschut, J. and Hoekstra, D., editors, *Membrane Fusion*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Kobayashi, S., Shirai, T., Kiyokawa, E., Mochizuki, N., Matsuda, M., and Fukui, Y. (2001). Membrane recruitment of DOCK180 by binding to PtdIns(3,4,5)P₃. *Biochem J*, 354(Pt 1):73–8.
- Kouroku, Y., Soyama, A., Fujita, E., Urase, K., Tsukahara, T., and Momoi, T. (1998). RA70 is a src kinase-associated protein expressed ubiquitously. *Biochem Biophys Res Commun*, 252(3):738–42.
- Kreisköther, N., Reichert, N., Buttgereit, D., Hertenstein, A., Fischbach, K., and Renkawitz-Pohl, R. (2006). *Drosophila* Rolling pebbles colocalises and putatively interacts with alpha-Actinin and the Sls isoform Zormin in the Z-discs of the sarcomere and with Dumbfounded/Kirre, alpha-Actinin and Zormin in the terminal Z-discs. *J Muscle Res Cell Motil*, 27.
- Kremser, T., Hasenpusch-Theil, K., Wagner, E., Buttgereit, D., and Renkawitz-Pohl, R. (1999). Expression of the *beta3 tubulin* gene (beta Tub60D) in the visceral mesoderm of *Drosophila* is dependent on a complex enhancer that binds Tinman and UBX. *Mol Gen Genet*, 262(4-5):643–58.

- Kurtz, F. (2003). Analyse potentieller spezifischer interaktionen zwischen rolling pebbles und weiteren für die myoblastenfusion essentiellen proteinen mit dem hefe-two-hybrid-system; und versuche zur detektion von rols6+7 in embryo-proteinextrakt.
- Kusch, T. and Reuter, R. (1999). Functions for *Drosophila* Brachyenteron and Fork-head in mesoderm specification and cell signalling. *Development*, 126(18):3991–4003.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, (227):680–685.
- Lamorte, L., Rodrigues, S., Sangwan, V., Turner, C., and Park, M. (2003). Crk associates with a multimolecular Paxillin/GIT2/beta-PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of Paxillin to focal contacts. *Mol Biol Cell*, 14(7):2818–31.
- Lawrence, P. and Johnston, P. (1989). *Development*, 105(4):761–767.
- Lee, H. and Frasch, M. (2000). Wingless effects mesoderm patterning and ectoderm segmentation events via induction of its downstream target *sloppy paired*. *Development*, 127(24):5497–508.
- Lemmon, M. (2004). Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 5):707–11.
- Lemmon, M. (2005). Pleckstrin homology domains: two halves make a hole? *Cell*, 120(5):574–6.
- Lemmon, M., Ferguson, K., and Abrams, C. (2002). Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett*, 513(1):71–6.
- Leptin, M., Casal, J., Grunewald, B., and Reuter, R. (1992). Mechanisms of early *Drosophila* mesoderm formation. *Dev Suppl*, pages 23–31.
- Leptin, M. and Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development*, 110(1):73–84.
- Li, L., Guris, D., Okura, M., and Imamoto, A. (2003). Translocation of CrkL to focal adhesions mediates integrin-induced migration downstream of Src family kinases. *Mol Cell Biol*, 23(8):2883–92.
- Li, L., Okura, M., and Imamoto, A. (2002). Focal adhesions require catalytic activity of Src family kinases to mediate integrin-matrix adhesion. *Mol Cell Biol*, 22(4):1203–17.
- Lin, D. M., Fetter, R. D., Kopczynski, C., Grenningloh, G., and Goodman, C. S. (1994). Genetic analysis of fasciclin ii in *Drosophila*: defasciculation, refasciculation and altered fasciculation. *Neuron*, (13):1055–1069.
- Linder, S. and Kopp, P. (2005). Podosomes at a glance. *J Cell Sci*, 118(Pt 10):2079–82.

- Lockwood, W. and Bodmer, R. (2002). The patterns of wingless, decapentaplegic, and tinman position the *Drosophila* heart. *Mech Dev*, 114(1-2):13–26.
- Loren, C., Englund, C., Grabbe, C., Hallberg, B., Hunter, T., and Palmer, R. (2003). A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep*, 4(8):781–6.
- Loren, C., Scully, A., Grabbe, C., Edeen, P., Thomas, J., McKeown, M., Hunter, T., and Palmer, R. (2001). Identification and characterization of DAlk: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation *in vivo*. *Genes Cells*, 6(6).
- Ma, A. and Abrams, C. (1999). Pleckstrin induces cytoskeletal reorganization via a Rac-dependent pathway. *J Biol Chem*, 274(40):28730–5.
- Machado, C. and Andrew, D. (2000). D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J Cell Biol*, 151(3):639–52.
- Marie-Cardine, A., Bruyns, E., Eckerskorn, C., Kirchgessner, H., Meuer, S., and Schraven, B. (1997). Molecular cloning of SKAP55, a novel protein that associates with the protein tyrosine kinase p59fyn in human T-lymphocytes. *J Biol Chem*, 272(26):16077–80.
- Marie-Cardine, A., Hendricks-Taylor, L., Boerth, N., Zhao, H., Schraven, B., and Koretzky, G. (1998). Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *J Biol Chem*, 273(40):25789–95.
- Markin, V., Kozlov, M., and Borovjagin, V. (1984). On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *Gen Physiol Biophys*, 3(5):361–77.
- Martin, B., Ruiz-Gomez, M., Landgraf, M., and Bate, M. (2001). A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in the *Drosophila* embryo. *Development*, 128(17):3331–8.
- Menon, S. and Chia, W. (2001). *Drosophila rolling pebbles*: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev Cell*, 1(5):691–703.
- Menon, S., Osman, Z., Chenchill, K., and Chia, W. (2005). A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*. *J Cell Biol*, 169(6):909–20.
- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X., Edouard, P., Howes, S., Keith JC, J., and McCoy, J. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403(6771):785–789.
- Michelson, A. (1996). A new turn (or two) for twist. *Science*, 272(5267):1449–50.
- Michelson, A., Abmayr, S., Bate, M., Arias, A., and Maniatis, T. (1990). Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Genes Dev*, 4(12A):2086–97.

- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T. (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*, 391(6662):93–6.
- Miki, H. and Takenawa, T. (2003). Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem (Tokyo)*, 134(3):309–13.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, 408(6813):732–5.
- Miller, A. The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*. In *Biology of Drosophila*.
- Mohler, W., Shemer, G., del Campo, J., Valansi, C., Opoku-Serebuoh, E., Scranton, V., Assaf, N., White, J., and Podbilewicz, B. (2002). The type I membrane protein EFF-1 is essential for developmental cell fusion. *Dev Cell*, 2:355–62.
- Monks, C., Freiberg, B., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 395(6697):82–6.
- Negulescu, P., Krasieva, T., Khan, A., Kerschbaum, H., and Cahalan, M. (1996). Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity*, 4(5):421–30.
- Ngyuen, H. and Xu, X. (1998). *Drosophila mef2* expression during mesoderm development is controlled by a complex array of cis-acting regulatory modules. *Dev Biol*, (204):550–556.
- Nolan, K., Barrett, K., Lu, Y., Hu, K., Vincent, S., and Settleman, J. (1998). Myoblast city, the *Drosophila* homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev*, 12(21):3337–42.
- Nose, A., Isshiki, T., and Takeichi, M. (1998). Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene. *Development*, 125(2):215–23.
- Obenauer, J., Cantley, L., and Yaffe, M. (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3635–41.
- Oldziej, S., Czaplewski, C., Liwo, A., Chinchio, M., Nancias, M., Vila, J., Khalili, M., Arnautova, Y., Jagielska, A., Makowski, M., Schafroth, H., Kazmierkiewicz, R., and Ripoll, D. (2005). Physics-based protein-structure prediction using a hierarchical protocol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(21):7547–52.
- Onel, S., Bolke, L., and Klamt, C. (2004). The *Drosophila* ARF6-GEF Schizo controls commissure formation by regulating Slit. *Development*, 131(11):2587–94.

-
- Overington, J., Donnelly, D., Johnson, M., Sali, A., and Blundell, T. (1992). Environment-specific amino acid substitution tables: tertiary templates and prediction of protein folds. *Protein Sci*, 1(2):216–26.
- Pacifico, S., Liu, G., Guest, S., Parrish, J., Fotouhi, F., and Finley RL, J. (2006). A database and tool, IM Browser, for exploring and integrating emerging gene and protein interaction data for *Drosophila*. *BMC Bioinformatics*, 7:195.
- Park, S. and Shahabuddin, M. (2000). Structural organization of posterior midgut muscles in mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *J Struct Biol*, 129(1):30–7.
- Paterson, H., Savopoulos, J., Perisic, O., Cheung, R., Ellis, M., Williams, R., and Katan, M. (1995). Phospholipase C delta 1 requires a pleckstrin homology domain for interaction with the plasma membrane. *Biochem J*, 312 (Pt 3):661–6.
- Paululat, A., Holz, A., and Renkawitz-Pohl, R. (1999). Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev*, 83(1-2):17–26.
- Pavlat, G. and Horsley, V. (2003). Cell fusion in skeletal muscle—central role of NFATC2 in regulating muscle cell size. *Cell Cycle*, 2(5):420–3.
- Penninger, J. and Crabtree, G. (1999). The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell*, 96(1):9–12.
- Pirotta, V. (1986). Cloning *Drosophila* genes. In Roberts, D. B., editor, *Drosophila: a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Poulson, D. F. (1950). Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster* meigen. In Demerec, M., editor, *Biology of Drosophila*. Hafner, New York.
- Primakoff, P., Hyatt, H., and Tredick-Kline, J. (1987). Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol*, 104(1):141–9.
- Prlic, A., Domingues, F., and Sippl, M. (2000). Structure-derived substitution matrices for alignment of distantly related sequences. *Protein Eng*, 13(8):545–50.
- Punternvoll, P., Linding, R., Gemund, C., Chabanis-Davidson, S., Mattingsdal, M., Cameron, S., Martin, D., Ausiello, G., Brannetti, B., Costantini, A., Ferre, F., Maselli, V., and Via, A. (2003). ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3625–30.
- Qian, B. and Goldstein, R. (2002). Optimization of a new score function for the generation of accurate alignments. *Proteins*, 48(4):605–10.
- Radhakrishna, H., Klausner, R., and Donaldson, J. (1996). Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol*, 134(4):935–47.

- Rau, A., Buttgereit, D., Holz, A., Fetter, R., Doberstein, S., Paululat, A., Staudt, N., Skeath, J., Michelson, A., and Renkawitz-Pohl, R. (2001). *rolling pebbles* (*rols*) is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development*, 128(24):5061–73.
- Rebecchi, M. and Scarlata, S. (1998). Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27:503–28.
- Reichert, N. (2004). Entwicklung von myotuben bei *Drosophila melanogaster*: Analyse zweier ems induzierter mutanten und protein-protein wechselwirkungen zwischen rolling pebbles und weiteren fusions-relevanten proteinen.
- Reuter, R. and Leptin, M. (1994). Interacting functions of Snail, Twist and Hucklebein during the early development of germ layers in *Drosophila*. *Development*, 120(5):1137–50.
- Richardson, B. E., Beckett, K. L., and Baylies, M. K. (2006). Actin remodeling is critical for myoblast fusion.
- Ridley, A. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, 114(Pt 15):2713–22.
- Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R., and Leptin, M. (1997). Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development*, 124(15):2915–22.
- Riechmann, V., Rehorn, K., Reuter, R., and Leptin, M. (1998). The genetic control of the distinction between fat body and gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development*, 125(4):713–23.
- Rizo, J. and Sudhof, T. (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci*, 3(8):641–53.
- Rogers, S., Wiedemann, U., Stuurman, N., and Vale, R. (2003). Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol*, 162(6):1079–88.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97(2):221–31.
- Roll, R., Bauman, E., Bennett, J., and Abrams, C. (2000). Phosphorylated pleckstrin induces cell spreading via an integrin-dependent pathway. *J Cell Biol*, 150(6):1461–6.
- Rubin, G. and Spradling, A. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218(4570):348–353.
- Rudd, C. and Wang, H. (2003). Hematopoietic adaptors in T-cell signaling: potential applications to transplantation. *Am J Transplant*, 3(10):1204–10.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M., and Bate, M. (2000). *Drosophila dumbfounded*: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell*, 102(2):189–98.

- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Suster, M., Landgraf, M., and Bate, M. (2002). *myoblasts incompetent* encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*. *Development*, 129(1):133–41.
- Ruiz-Gomez, M., Romani, S., Hartmann, C., Jackle, H., and Bate, M. (1997). Specific muscle identities are regulated by Kruppel during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, 124(17):3407–14.
- Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S., Michelson, A., and Bate, M. (1995). Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development*, 121(7):1979–88.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandborn, E., Duclos, S., Messier, P., and Roberge, J. (1967). Atypical intestinal striated muscle in *Drosophila melanogaster*. *J Ultrastruct Res*, 18(5):695–702.
- Sander, C. and Schneider, R. (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins*, 9(1):56–68.
- Schaefer, G., Weber, S., Holz, A., Bogdan, S., Renkawitz-Pohl, R., and Oenel, S. (2006). The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein WASP is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Biol in revision*.
- Schraven, B., Marie-Cardine, A., and Koretzky, G. (1997). Molecular analysis of the fyn-complex: cloning of SKAP55 and SLAP-130, two novel adaptor proteins which associate with fyn and may participate in the regulation of T cell receptor-mediated signaling. *Immunol Lett*, 57(1-3):165–9.
- Schroeter, R. (2003). Untersuchungen zur entwicklung der zirkulären mitteldarmmuskulatur von *Drosophila melanogaster*: Aspekte zum gen *blown fuse* und ultrastrukturelle analysen.
- Secundino, N., Nacif-Pimenta, R., Hajmova, M., Volf, P., and Pimenta, P. F. P. (2005). Midgut muscle network in *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus duboscqi* sand flies: spatial organization and structural modification after blood meal. *Arthropod Sturcture and Development*, 34(2):153–167.
- Sellin, J., Albrecht, S., Kolsch, V., and Paululat, A. (2006). Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing heart enhancer elements of the *Drosophila melanogaster* bHLH transcription factor Hand. *Gene Expr Patterns*, 6(4):360–75.
- Shemer, G., Suissa, M., Kolotuev, I., Nguyen, K., Hall, D., and Podbilewicz, B. (2004). EFF-1 is sufficient to initiate and execute tissue-specific cell fusion in *C. elegans*. *Curr Biol*, 14(17):1587–91.
- Shishido, E., Higashijima, S., Emori, Y., and Saigo, K. (1993). Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development*, 117(2):751–61.

- Shishido, E., Ono, N., Kojima, T., and Saigo, K. (1997). Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development*, 124(11):2119–28.
- Siegel, D. (1993). Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophys J*, 65(5):2124–40.
- Simeoni, L., Kliche, S., Lindquist, J., and Schraven, B. (2004). Adaptors and linkers in T and B cells. *Curr Opin Immunol*, 16(3):304–13.
- Skehel, J. and Wiley, D. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 69:531–69.
- Snapper, S. and Rosen, F. (1999). The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol*, 17:905–29.
- Snyder, J., Singer, A., Wing, M., Harden, T., and Sondek, J. (2003). The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta2 as an effector site for Rac. *J Biol Chem*, 278(23):21099–104.
- Songyang, Z., Margolis, B., Chaudhuri, M., Shoelson, S., and Cantley, L. (1995). The phosphotyrosine interaction domain of SHC recognizes tyrosine-phosphorylated NPXY motif. *J Biol Chem*, 270(25):14863–6.
- Soto, M., Qadota, H., Kasuya, K., Inoue, M., Tsuboi, D., Mello, C., and Kaibuchi, K. (2002). The GEX-2 and GEX-3 proteins are required for tissue morphogenesis and cell migrations in *C. elegans*. *Genes Dev*, 16(5):620–32.
- Stark, C., Breitkreutz, B., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., and Tyers, M. (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue):D535–9.
- Stauffer, T., Ahn, S., and Meyer, T. (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Curr Biol*, 8(6):343–6.
- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T. (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J*, 23(4):749–59.
- Steller, H. and Pirotta, V. (1986). P-transposons controlled by heat shock promoter. *Mol Cell Biol*, (6):1640–1646.
- Stephens, L., Jackson, T., and Hawkins, P. (1993). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim Biophys Acta*, 1179(1):27–75.
- Strasburger, E. (1935). *Drosophila melanogaster meig, Eine Einführung in den Bau und die Entwicklung*. Julius Springer, Berlin.
- Strasburger, M. (1932). Bau, funktion und variabilität des darmtractus von *Drosophila melanogaster* meigen. *Z wiss Zool*, 140:539–649.

-
- Strunkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L., Hertenstein, A., de Couet, H., Ramos, R., and Fischbach, K. (2001). *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development*, 128(21):4229–39.
- Stute, C., Schimmelpfeng, K., Renkawitz-Pohl, R., Palmer, R., and Holz, A. (2004). Myoblast determination in the somatic and visceral mesoderm depends on Notch signalling as well as on *milliways*(*mili*(Alk)) as receptor for *Jeb* signalling. *Development*, 131(4):743–54.
- Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2002). Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell*, 3(5):645–58.
- Takenawa, T. and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci*, 114(Pt 10):1801–9.
- Tan, Y., Huang, H., and Kihara, D. (2006). Statistical potential-based amino acid similarity matrices for aligning distantly related protein sequences. *Proteins*.
- Tatusov, R., Koonin, E., and Lipman, D. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science*, 278(5338):631–7.
- Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989). A nonradioactive in situ hybridization method for the localization of specific rnas in *Drosophila* embryos reveals a translation control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma*, (98):81–85.
- Taylor, M. (1996). A myogenic switch. Muscle development. *Curr Biol*, 6(8):924–6.
- Taylor, M. (1998). Muscle development: a transcriptional pathway in myogenesis. *Curr Biol*, 8(10):R356–8.
- Taylor, M. (2000). Muscle development: molecules of myoblast fusion. *Curr Biol*, 10(17):R646–8.
- Taylor, M. (2002). Muscle differentiation: how two cells become one. *Curr Biol*, 12(6):R224–8.
- Taylor, M. (2003). Muscle differentiation: signalling cell fusion. *Curr Biol*, 13(24):R964–6.
- Tepass, U. and Hartenstein, V. (1994). Epithelium formation in the *Drosophila* midgut depends on the interaction of endoderm and mesoderm. *Development*, 120(3):579–90.
- Thisse, C. and Thisse, B. (1992). Dorsoventral development of the *Drosophila* embryo is controlled by a cascade of transcriptional regulators. *Dev Suppl*, pages 173–81.
- Tomancak, P., Beaton, A., Weiszmam, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S., Richards, S., Ashburner, M., Hartenstein, V., Celniker, S., and Rubin, G. (2002). Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol*, 3(12):E-Pub.

-
- Van Vactor, D., Sink, H., Fambrough, D., Tsoo, R., and Goodman, C. (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell*, 73(6):1137–53.
- Varnai, P. and Balla, T. (1998). Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol*, 143(2):501–10.
- Volk, T. (1999). Singling out *Drosophila* tendon cells: a dialogue between two distinct cell types. *Trends Genet*, 15(11):448–53.
- Wakelam, M. (1985). The fusion of myoblasts. *Biochem J*, 228(1):1–12.
- Wang, H., Moon, E., Azouz, A., Wu, X., Smith, A., Schneider, H., Hogg, N., and Rudd, C. (2003). SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat Immunol*, 4(4):366–74.
- Watton, S. and Downward, J. (1999). Akt/PKB localisation and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. *Curr Biol*, 9(8):433–6.
- Weiss, J., Suyama, K., Lee, H., and Scott, M. (2001). Jelly belly: a *Drosophila* LDL receptor repeat-containing signal required for mesoderm migration and differentiation. *Cell*, 107(3):387–98.
- Wilson, C., Kreychman, J., and Gerstein, M. (2000). Assessing annotation transfer for genomics: quantifying the relations between protein sequence, structure and function through traditional and probabilistic scores. *J Mol Biol*, 297(1):233–49.
- Wolfsberg, T., Primakoff, P., Myles, D., and White, J. (1995). ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol*, 131(2):275–8.
- Wu, L., Yu, Z., and Shen, S. (2002). SKAP55 recruits to lipid rafts and positively mediates the MAPK pathway upon T cell receptor activation. *J Biol Chem*, 277(43):40420–7.
- Wulfig, C., Sjaastad, M., and Davis, M. (1998). Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11):6302–7.
- Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y., and Fujisawa-Sehara, A. (1995). A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature*, 377(6550):652–6.
- Zhang, Y., Featherstone, D., Davis, W., Rushton, E., and Broadie, K. (2000). *Drosophila* D-titin is required for myoblast fusion and skeletal muscle striation. *J Cell Sci*, 113 (Pt 17):3103–15.

Anhang

Alignments der Aminosäure-Sequenz des Blown fuse Proteins aus *Drosophila melanogaster* mit anderen Spezies.



Abbildung 23.3.: Sequenz-Alignment des Blown fuse-Proteins aus *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, *Drosophila yakuba* und *Drosophila pseudoobscura*. In allen Sequenzen sind die PH-Domäne und die möglichen Bindestellen für die oben bestimmten SH3 und SH2-Domänen konserviert. Darüberhinaus erscheinen viele Serin- bzw. Threonin-phosphorylierungsstelle konserviert.

209

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Renate Renkawitz-Pohl für die Betreuung dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich danken:

- Frau Prof. Monika Hassel für die Übernahme des zweiten Gutachtens
- Herrn Prof. Lothar Beck und Helga Kisselbach-Heckmann für die Unterstützung bei der Durchführung der Elektronenmikroskop-Studien
- Ruth Hyland für die Durchführung der meisten Mikroinjektionen
- Sven Bogdan und Fran Fogerty für zur Verfügung gestellte Fliegen und Antikörper, sowie Wolf Hütteroth und Keram für die *Manduca*- bzw. *Schistocerca*-Larven.
- der Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl für ein stets angenehmes Arbeitsklima
- Angela, Christina, Connie, Fabo, Kathrin und Papa für kritische und hilfreiche Korrekturvorschläge
- dem Land Hessen für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dirk und unseren Familien für die fortwährende geistige und emotionale Unterstützung.

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

Unterschiedliche Rollen des Adaptor-Proteins Blown fuse/Skap-Hom/Scap2 und des Aktin-Regulators Kette/Hem2/Nap1 während der somatischen und viszerale Myogenese von *Drosophila melanogaster*

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Roxane Henriette Schröter

Marburg, den

Lebenslauf

Roxane Henriette Schröter,
geboren am 14. August 1977
in Frankfurt am Main

1984 bis 1988 Besuch der Freiligrath-Grundschule in Frankfurt am Main/Fechenheim

1988 bis 1997 Besuch des Heinrich-von-Gagern-Gymnasiums in Frankfurt am Main,
Abschluss Abitur (1,4)

1997 bis 1999 Studium der Biologie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
in Frankfurt am Main, Abschluss Vordiplom (1,2)

1998 bis 1999 Studium der Geologie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

1999 bis 2003 Studium der Biologie und Geologie an der Philipps-Universität in
Marburg, Abschluss des Biologie-Studiums mit dem Diplom (1,3), Schwer-
punktfächer Entwicklungsbiologie und Parasitologie, Allgemeine Zoologie und
Evolution der Tiere, Tierphysiologie

seit 2003 Anfertigung der vorliegenden Dissertation